Lumineszenzspektroskopische Untersuchung zeitabhängiger Systeme: Apparatur und Verfahren zur Messung von Fluoreszenz und Chemilumineszenz der Lucigenin-H_2O_2-Reaktion

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
vorgelegt der Abteilung für Chemie
der Ruhr-Universität Bochum

von

Hans Ulrich Weber

aus Opladen

Bochum 1981

Lumineszenzspektroskopische Untersuchung zeitabhängiger Systeme: Apparatur und Verfahren zur Messung von Fluoreszenz und Chemilumineszenz der Lucigenin-H_2O_2-Reaktion

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
vorgelegt der Abteilung für Chemie
der Ruhr-Universität Bochum

von

Hans Ulrich Weber

aus Opladen

Bochum 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

eingereicht am: 27. 1. 1981

mündliche Prüfung am: 19. 2. 1981

Referent: Prof. Dr. G. Bergmann

Korreferent: Prof. Dr. H. Specker

Diese Arbeit wurde am Lehrstuhl für Analytische Chemie der Ruhr-Universität Bochum in der Zeit von September 1976 bis Juni 1980 durchgeführt

Herrn Prof. Dr. G. Bergmann danke ich herzlich für die hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit

Bei allen Kollegen bedanke ich mich für die ständige Diskussionsbereitschaft

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

2. Ausgangsposition der Arbeit 3

2.1. Literaturübersicht 3

2.1.1. Mehrkomponentenanalyse im Bereich der Fluoreszenzspektroskopie 3

2.1.2. Spektroskopische Messung zeitlich veränderlicher Systeme 9

2.2. Aufgabenstellung und Abstecken der Teilgebiete 14

3. Grundlagen der Chemilumineszenz 16

3.1. Übersicht chemilumineszierender Reaktionen 16

3.2. Theoretische Aspekte 22

3.3. Analytische Anwendung der Chemilumineszenz 28

4. Aufbau eines digitalen Steuerungs- und Datenerfassungssystems 31

4.1. Beschreibung des vorhandenen Meßsystems 32

4.2. Erweiterung des Systems zur digitalen Erfassung von Fluoreszenzdaten 35

4.2.1. Aufbau der Hardware-Ansteuerlogik für Wellenlängen 35

4.2.2. Ausbau der Apparatur zu einem On-line Steuerungs- und Datenerfassungssystem mit Hilfe eines KIM-1-Mikrorechners 39

4.2.3. Beschreibung der Steuerung, Datenaufnahme und Ausgabe 43

4.3. Geräteparameter 50

4.3.1. Eichung der Monochromatoren 50

4.3.2. Bestimmung der spektralen Spaltbreite 55

4.3.3. Bestimmung des Rauschens 57

5. Quantitative Untersuchungen von Fluoreszenzspektren 61

5.1. Berechnung von Fluoreszenzstrahlungsflüssen 61

5.2. Messung und Verarbeitung der Fluoreszenzspektren von Anthracen 72

5.3. Vergleich der gemessenen und berechneten Spektren von Anthracen 81

5.4. Verringerung des inneren Filtereffekts durch Veränderung des Probenraums 89

6. Untersuchung der Reaktion von Lucigenin mit H_2O_2 in alkalischer Lösung 92

6.1. Theorien des Reaktionsmechanismus 92

6.2. Die Fluoreszenz des Reaktionssystems 98

6.2.1. Berechnung der Konzentrationen eines Zweikomponentensystems 98

6.2.2. Bestimmung der kinetischen Daten einer Reaktion 1. Ordnung 100

6.2.3. Berücksichtigung der Kinetik bei der Konzentrationsberechnung 102

6.2.4. Ermittlung und Verarbeitung der mit der Fluoreszenzspektroskopie gewonnenen Meßdaten 106

6.2.4.1. Eichung des Systems 106

6.2.4.2. Untersuchung des Quenchings der Lucigeninfluoreszenz durch NaOH 110

6.2.4.3. Der Meßvorgang 112

6.2.5. Diskussion der Ergebnisse 115

6.2.6. Bestimmung der Nachweisgrenzen 130

6.3. Die Chemilumineszenz des Reaktionssystems 132

6.3.1. Das Meßverfahren 132

6.3.2. Kinetik der Chemilumineszenz 133

6.3.3. Korrektur der Chemilumineszenzspektren 141

6.4. Anwendung der Lucigenin-Chemilumineszenz zur katalytischen Kobaltbestimmung 143
6.4.1. Theorien des Mechanismus 143
6.4.2. Bestimmung der kinetischen Daten bei Variation der Reaktionsparameter 144
6.4.3. Vorschrift zur quantitativen Analyse von Kobalt(II)-Ionen 150

6.5. Diskussion des Reaktionsmechanismus 154

7. Zusammenfassung 162

8. Literaturverzeichnis 167

A Anhang 174

A 1. Verwendete Substanzen 174

A 2. Faktoren zur Berechnung wahrer Fluoreszenzspektren 175

A 3. Beschreibung der Rechenprogramme 176
A 3.1. KONZ 176
A 3.2. INTBER 179

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

A = $\epsilon_a \cdot c \cdot m$ [1/cm]
a = Geometriefaktor [cm]
b = Geometriefaktor [cm]
c = Konzentration [mol/l]
$\underline{c}$ = Nachweisgrenze [mol/l]
d = Geometriefaktor [cm]
dN_A = Zahl der absorbierten Quanten
dN_F = Zahl der emittierten Quanten
E = Extinktion
$E.$ = relative Einheiten für Lumineszenzstrahlungsflüsse (bezogen auf Fluoreszenzstandard)
e = Geometriefaktor [cm]
F = Fluoreszenzstrahlungsfluß [W] oder [E.]
F_C = Strahlungsfluß der Chemilumineszenz [W] oder [E.]
$F(\lambda)$ = Korrekturfunktion für Emissionsspektren
f = Verstärkungsfaktor
$f(\lambda)$ = Spaltfunktion des Fluorimeters
g = Koeffizienten zur Beschreibung von $f(\lambda)$
h = Geometriefaktor [cm]
I = Strahlungsfluß [W] oder [E.]
$\underline{I}$ = Strahlungsfluß an der Nachweisgrenze [W] oder [E.]
k = Geschwindigkeitskonstante [1/s]
$\underline{k}$ = Geschwindigkeitskonstante an der Nachweisgrenze [1/s]
M = Anzahl der registrierten Spektren bei einer kinetischen Messung
m = ln 10 = 2,303
N = Anzahl der registrierten Punkte pro Spektrum
Q = Emissionskoeffizient [E.·l/mol]
q = Quantenausbeute
q_a = Anregungswahrscheinlichkeit

R = $\epsilon_f \cdot c \cdot m$ [1/cm]
S/N = Signal-Rausch-Verhältnis
s = Schrittzahl
s_x = Schätzwert der Standardabweichung des Parameters x
s_{Bl} = Rauschen des Dunkelstroms [mV]
s_I = Schrotrauschen [mV]
t = Reaktionszeit [min] oder [s]
x = Koordinate in Richtung des Anregungslichts [cm]
y = Koordinate in Richtung des Emissionslichts [cm]

ϵ_a = Extinktionskoeffizient bei der Anregungswellenlänge [$l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$]
ϵ_f = Extinktionskoeffizient bei der Emissionswellenlänge [$l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$]
ν = Frequenz [1/s]
λ = Wellenlänge [nm]

1. Einleitung

Lumineszenzerscheinungen werden durch Elektronenübergänge von einem elektronisch angeregten Zustand zum Grundzustand hervorgerufen. Hierbei wird elektromagnetische Strahlung freigesetzt, welche sich mit geeigneten Detektoren registrieren läßt. Die Energieverteilung ist charakteristisch für die lumineszierende Substanz (1).
Die für die qualitative und quantitative Analyse gebräuchliche Methode der Elektronenanregung ist die Bestrahlung einer Probe mit elektromagnetischer Strahlung. Die daraus resultierende Emission wird als "optische Lumineszenz" bezeichnet. Sie läßt sich in Fluoreszenz und Phosphoreszenz unterteilen, je nachdem, ob der Elektronenübergang von einem angeregten Singulett- oder Triplettzustand zum Singulett-Grundzustand erfolgt. Der Fluoreszenz kommt dabei die weitaus größere Bedeutung zu, da der Phosphoreszenzeffekt auf verbotenen Elektronenübergängen basiert, weshalb die Intensitäten zumeist sehr gering sind (2,3,4). Ein unter Aussendung von Fluoreszenz verlaufender Übergang ist wesentlich wahrscheinlicher, obwohl nur ein Teil der lichtabsorbierenden Substanzen auch fluoresziert. Daraus und aus der Tatsache, daß sich diese Stoffe nicht nur im Absorptions-, sondern auch im Emissionsspektrum unterscheiden, resultiert die größere Selektivität der Fluorimetrie gegenüber der UV-VIS-Spektroskopie. Die bei der Emissionsmethode vorhandene direkte Abhängigkeit zwischen meßbarer Intensität und Konzentration des Fluorophors äußert sich

in einer hohen Empfindlichkeit, sowie in Nachweisgrenzen, welche um mehrere Größenordnungen unter den mit Absorptionsverfahren erreichbaren liegen können.

Nachteilig wirken sich in der Fluoreszenzspektroskopie Effekte aus, welche die Linearität der Konzentrations-Intensitäts-Beziehung, besonders in höheren Konzentrationsbereichen, beeinflussen. Hier sind vor allem innere Filtereffekte und Quenching zu nennen, aber auch durch das Anregungslicht hervorgerufene Reaktionen des Fluorophors, wie z. B. Dimerisierung. Solche Effekte erschweren eine quantitative Analyse erheblich. Die Anwendung geeigneter mathematischer Modelle ermöglicht es jedoch, Konzentrationsbestimmungen auf iterativem Weg durchzuführen. Durch eine Kopplung der Fluorimeter mit Rechnern wird die dazu notwendige Datenerfassung und -verarbeitung erheblich vereinfacht.

Eine für den Analytiker ebenfalls wichtige Lumineszenzerscheinung ist die Chemilumineszenz (5,6). Hierbei wird die zur Anregung der Elektronen benötigte Energie durch eine chemische Reaktion aufgebracht, von deren Produkten mindestens eins in einem elektronisch angeregten Zustand entstehen muß. Aus der zeitlichen Änderung der Strahlungsintensität können Rückschlüsse auf den Reaktionsmechanismus und die Konzentrationen der beteiligten Reaktionspartner oder Katalysatoren gewonnen werden.

Auch bei der Anwerdung dieser "katalytischen Analysenmethode" ist es sinnvoll, die Erfassung und Verarbeitung der anfallenden großen Datenmengen durch die Kopplung des Meßgeräts mit einem Rechner zu vereinfachen.

2. Ausgangsposition der Arbeit

2.1. Literaturübersicht

2.1.1. Mehrkomponentenanalyse im Bereich der Fluoreszenzspektroskopie

Die meisten Verfahren der quantitativen Analyse, sowohl von Reinsubstanzen als auch von Gemischen, gehen von der Linearität der Konzentrations-Intensitäts-Beziehung aus. Diese Bedingung ist für kleine Extinktionen sehr gut erfüllt. Ebenso gilt, daß sich die Fluoreszenzintensitäten eines Gemisches aus der Summe der Intensitäten der Komponenten ergeben, sofern Wechselwirkungen der Komponenten untereinander ausgeschlossen werden können (7).
Die Fluoreszenzintensität einer Substanz wird durch zwei stoffspezifische Konstanten bestimmt, den von den Anregungswellenlängen abhängigen Extinktionskoeffizienten und den Quantenausbeuten. Die Verteilung der emittierten Quanten ist dabei eine Funktion der Emissionswellenlänge. Darauf beruht die höhere Selektivität der Methode gegenüber der Absorptionsspektroskopie, wo das analytische Signal, die Extinktion, nur vom Extinktionskoeffizienten abhängt.

Diese hohe Selektivität ermöglicht es oft, eine Komponente in einem Gemisch zu bestimmen, indem durch geeignete Wahl von Anregungs- und Emissionswellenlänge die Fluoreszenz nur dieser Komponente beobachtet wird (8,9).
Oft überlagern sich jedoch sowohl Anregungs- als auch Emissionsspektren, besonders in Gemischen chemisch ähn-

licher Substanzen, z.B. polycyclischer Aromaten. Will man hier nur die Fluoreszenz einer Komponente messen, müssen spezielle Verfahren herangezogen werden. Bei der Anwendung von Löschverfahren verhindern geeignete Quencher die Fluoreszenzfähigkeit störender Komponenten. So wird die Fluoreszenz alternierender polycyclischer Aromaten durch Elektronenakzeptoren gelöscht, während nicht alternierende Polyaromaten, das sind solche mit Fluoranthengerüst, bei Anwesenheit von Elektronendonatoren nicht fluoreszieren (10,11,12). Andere Möglichkeiten zur selektiven Fluoreszenzlöschung ergeben sich bei Verwendung von Sauerstoff (13) oder Schwermetallen (14,15) als Quencher. Auch durch chemische Reaktionen können die störenden Komponenten beseitigt (16) oder in Verbindungen überführt werden, die unter den gegebenen Bedingungen nicht fluoreszieren.

Die Anzahl der "klassischen" Methoden der fluorimetrischen Mehrkomponentenanalyse kann durch Verwendung elektronischer Datenverarbeitungsgeräte noch erweitert werden. So berechnet Aghaizu (7) die Konzentrationen eines Gemisches aus den Anregungs- und Emissionsspektren nach:

$$\underline{F} = \underline{\underline{A}} \cdot \underline{C} \qquad (2.1)$$

Hierbei ist $\underline{F}$ der Intensitätsvektor der Mischung. Die einzelnen Elemente geben die Fluoreszenzintensitäten für verschiedene Kombinationen von Anregungs- und Emissionswellenlänge wieder. $\underline{C}$ ist der Konzentrationsvektor. Er hat so viele Elemente, wie Komponenten in der Mischung

sind. Die Matrix $\underline{\underline{A}}$ enthält die Emissionskoeffizienten sämtlicher Komponenten bei allen betrachteten Wellenlängenkombinationen. In den einzelnen a_{ij} sind die Extinktionskoeffizienten und Quantenausbeuten, sowie sämtliche Geräteparameter, wie spektrale Emissionsverteilung der Lichtquelle, Lichtleitwerte und spektrale Energieverteilung des Detektors, zusammengefaßt.

Bei Kenntnis der Emissionskoeffizientenmatrix ergeben sich die Konzentrationen aus der Auflösung der Gleichung nach $\underline{C}$. Bei überbestimmten Systemen, d.h. wenn die Anzahl der Meßstellen größer als die der Konzentrationen ist, kann die Auswertung nach dem Gauß'schen Algorithmus erfolgen (17).

Der gleiche mathematische Formalismus läßt sich auch auf Derivativ-Spektren anwenden, die durch elektronische Ableitung während der Scans oder durch Differenzierung der gespeicherten Spektren 0. Ordnung erhalten werden können. Obwohl sich das Signal-Rausch-Verhältnis durch das Differenzieren verkleinert, kann die Erhöhung der Auflösung zu einer statistischen Verbesserung der Mehrkomponentenanalyse führen (18).

Eine verwandte Methode, die jedoch einen höheren elektronischen Aufwand erfordert, ist die der "selektiven Modulation". Sie wird meist zur Analyse von Zweikomponentensystemen benutzt (19). Die Anregungswellenlänge wird hier in einem kleinen Bereich moduliert, der so gewählt wird, daß sich in ihm ein Absorptionsmaximum der einen Kompo-

nente befindet. Das Absorptionsspektrum der zweiten Komponente muß dort eine Flanke aufweisen. Dadurch wird das Fluoreszenzsignal der zweiten Komponente mit der Anregungsfrequenz moduliert, das der ersten Komponente jedoch mit der doppelten Frequenz. Durch einen frequenzselektiven Verstärker können die Emissionen beider Komponenten getrennt gemessen werden.

Die Nutzung der gesamten fluorimetrisch erfaßbaren Information kann durch die Auswertung einer 'Excitation-Emission-Matrix' (EEM) erfolgen. Eine EEM gibt die Intensitäten in Abhängigkeit von Anregungs- und Emissionswellenlänge wieder. Mit einem konventionellen Fluorimeter wird sie erhalten, indem für mehrere Anregungswellenlängen die Emissionsspektren aufgenommen werden (20,21). Die Aufnahme und Weiterverarbeitung der hier anfallenden großen Datenmengen wurde jedoch erst durch den Anschluß von Rechnern an die Spektrometer sinnvoll. Durch die Verwendung von Vielkanal-Detektoren wird die Aufnahme einer EEM wesentlich beschleunigt, da sich die Registrierzeit eines Spektrums auf wenige Millisekunden reduziert. Zu einer weiteren Beschleunigung der Messung trägt die Kreuzung der Dispersion von Anregungs- und Emissionsmonochromator in Verbindung mit einem zweidimensionalen Vidikonarray bei (22,23).

Die quantitative Auswertung der EEM einer Mischung kann über Least-Squares-Verfahren erfolgen (24). Dazu müssen aber die Standard- EEM's der Einzelkomponenten bekannt

sein. Die qualitative und quantitative Analyse einer Mischung unbekannter Zusammensetzung kann über eine Eigenwertanalyse der EEM durchgeführt werden (25). Moses (26) erarbeitete statistische Kriterien dafür und untersuchte sie an Hand einer Dreikomponentenanalyse, wobei er die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Fluorimeter-Rechner-Kombination benutzte.

Sind Anregungs- und Emissionsspektren vertikale bzw. horizontale Schnitte durch eine EEM, so kann man sich ein "Synchron-Spektrum" als diagonalen Schnitt vorstellen (27). Hier werden Anregungs- und Emissionsmonochromator gleichzeitig mit einem geringen konstanten Wellenlängenabstand bewegt. Dieser Abstand entspricht der Stoke'schen Verschiebung für die zu untersuchende Komponente. Dadurch wird die Empfindlichkeit für diese Komponente gegenüber anderen erhöht. Für mehrere Komponenten mit etwa gleichem Stokes-Shift ergibt sich eine gesteigerte Selektivität, die aus den gegenüber einem "normalen" Fluoreszenzspektrum schmaleren Banden resultiert (28).

Die oben genannten Verfahren basieren alle auf der linearen Abhängigkeit zwischen Intensität und Konzentration der Einzelkomponente sowie auf der Additivität der Einzelintensitäten. Diese Voraussetzungen gelten jedoch nur für verdünnte Proben. Mit steigender Konzentration nehmen der innere Filtereffekt und die Reabsorption des Fluoreszenzlichtes zu, so daß die Steigung der Konzentrations-Intensitäts-Kurve abnimmt.

Der innere Filtereffekt beschreibt die Absorption des Erregerlichts durch die fluoreszierende Substanz. Ist diese Absorption zu groß, werden nicht mehr alle Volumenelemente des Beobachtungsraums gleich ausgeleuchtet. Die Intensitätsabnahme der Erregerstrahlung erfolgt dann nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz in einer Exponentialfunktion und kann nicht mehr durch einen linearen Ansatz approximiert werden. Reabsorption tritt bei Überlappung von Anregungs- und Emissionsspektrum auf. In diesem Wellenlängenbereich ausgestrahltes Fluoreszenzlicht wird teilweise wieder vom Fluorophor absorbiert, so daß mit steigender Konzentration eine scheinbare Abnahme der Quantenausbeute erfolgt.

Um auch in diesem Bereich eine quantitative Analyse durchführen zu können, muß der lineare Ansatz sowohl für jede einzelne Komponente, als auch für die Reabsorptionen der Komponenten untereinander korrigiert werden. Dazu werden verschiedene Modelle vorgeschlagen.

Die Korrektur des inneren Filtereffekts erfolgt zumeist durch eine Berechnung der in jedem Volumenelement effektiven Erregungsstrahlung und anschließende Integration der daraus resultierenden Fluoreszenzintensitäten in Anregungsrichtung über den Beobachtungsraum (29,30), bzw. Ersatz des Integrals durch eine Näherung (29). Für den Verlauf des emittierten Lichts können analoge Berechnungen durchgeführt werden (30-33). Leese und Wehry (31) berücksichtigen außerdem die spektrale Bandbreite des Emis-

sionsmonochromators und die spektrale Empfindlichkeit des Detektors bei der Berechnung der Intensitätsverteilung des Fluoreszenzlichts.
Für die Auflichtmethode lassen sich ähnliche Ableitungen durchführen, jedoch ist dabei noch zu berücksichtigen, daß der Detektor jeden Punkt des Probenraums unter einem anderen Winkel "beobachtet" (34).
Die Auswertung eines Ein- oder Mehrkomponentensystems erfolgt durch iterative Anpassung der Konzentrationsparameter, z.B. mit Hilfe eines Simplex-Programms, an das gemessene Spektrum (30). Eine ausführliche Diskussion eines solchen Verfahrens wird in Abschnitt 6 durchgeführt.

2.1.2. Spektroskopische Messung zeitlich veränderlicher Systeme

Auf Grund ihrer hohen Dynamik eignet sich die Fluoreszenzspektroskopie auch zur Untersuchung sich ändernder Systeme, wobei die Konzentrationen der beteiligten Substanzen um mehrere Größenordnungen variieren können. Meist wird bei einer oder zwei festen Wellenlängen gemessen, jedoch ist es auch möglich,Spektren aufzunehmen, wenn sich Änderungen des Systems gegenüber der Registrierzeit vernachlässigen lassen. Durch die Anwendung spezieller Methoden lassen sich heute schon Vorgänge im Nanosekundenbereich spektrometrisch verfolgen. Da bei

der Analyse zeitlich veränderlicher Systeme Probleme der Datenerfassung und -verarbeitung im Vordergrund stehen, soll in diesem Zusammenhang die Betrachtung nicht auf die Fluoreszenzspektroskopie beschränkt werden.
In der Hochdruckflüssigkeitschromatographie ist die Verwendung optischer Detektoren durchaus üblich (35,36). Hier bewährt sich auch die fluorometrische Detektion. Zur Erweiterung ihres Anwendungsbereichs auf nicht fluoreszierende Substanzen lassen sich Effekte der Fluoreszenzlöschung (37) oder auch die Verwendung fluoreszierender Gruppenreagenzien nutzen (38).
Die optische Detektion gaschromatographisch aufgetrennter Substanzen läßt sich sowohl durch Beobachtung des gasförmigen Eluenten in einer Durchflußküvette (39,40), wie auch, nach Extraktion der zu untersuchenden Substanzen mit einem geeigneten Lösungsmittel, durch Vermessen der flüssigen Phase durchführen (41,42).
Da die vollständige Auftrennung von größeren Substanzgemischen sehr zeitintensiv sein kann, wird teilweise nur eine Aufspaltung in Gruppen vorgenommen. Anschließend wird für jede Gruppe eine Mehrkomponentenanalyse durchgeführt. Staat (43) beschreibt die säulenchromatographische Auftrennung eines Gemisches polycyclischer Aromaten in Gruppen von maximal drei Komponenten. Die Bestimmung der Konzentrationen erfolgt über die Messung der Extinktionen bei mindestens drei Wellenlängen, welche cyclisch abgefragt wurden, und nachgeschaltete Auswertung über

einen Analogrechner. Dazu mußte die Koeffizientenmatrix vorher an einem statischen System bestimmt und in den Rechner eingegeben werden. Aus den erhaltenen Zeit-Konzentrations-Kurven für jede Komponente kann die Absolutbestimmung der Konzentrationen off-line durch Integration erfolgen.

Klukas (44) trennte polycyclische Aromaten mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie. Auch er registrierte die Absorption des Eluenten mit einem cyclischen Verfahren, bei dem bis zu zehn Meßstellen angefahren wurden. Die anfallenden Daten wurden auf Lochstreifen ausgegeben und off-line ausgewertet. Dabei konnten einerseits für jeden Cyclus die Konzentrationen der beteiligten Substanzen bestimmt werden, aus denen dann die Absolutbestimmung erfolgte; andererseits wurden die jeweils entsprechenden Extinktionen addiert, und mit der Summe wurde eine Mehrkomponentenanalyse durchgeführt. Die mit beiden Verfahren erhaltenen Ergebnisse sind identisch.

Auch für kinetische und katalytische Methoden ist die spektroskopische Detektion von großer Wichtigkeit. Hier wird die Geschwindigkeit der Einstellung eines Reaktionsgleichgewichts gemessen. Dieser Vorgang kann durch photometrische oder fluorimetrische Registrierung einer Ausgangs- oder Endkomponente geschehen. Aus der Änderung der Konzentration dieser Leitkomponente läßt sich die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmen. Alle anderen Reaktionspartner werden dabei im Überschuß eingesetzt, so daß

möglichst eine Reaktion Pseudo-1.-Ordnung in bezug auf die Leitkomponente vorliegt (45). Bei kinetischen Analysenverfahren wird die lineare Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten von einer der Überschußkomponenten zu deren Bestimmung ausgenutzt; bei katalytischen Verfahren ist es die lineare Beziehung zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Katalysatorkonzentration, die sich zur quantitativen Analyse des Katalysators heranziehen läßt. Heutzutage sind Reaktionen zum katalytischen Nachweis fast aller Elemente bekannt (46), besonders aber bei der Analyse von Enzymen werden solche Verfahren angewendet.

Während zur Bestimmung einer Geschwindigkeitskonstanten 1. Ordnung meist die Beobachtung der Leitkomponente bei einer Wellenlänge genügt, ist zur Aufklärung komplexer Reaktionen die Aufnahme ganzer Spektren nötig, um auftretende Zwischen- oder Nebenprodukte identifizieren zu können. Gauglitz und Reule (47)erweiterten ein herkömmliches Spektrometer in der Weise, daß durch cyclische Aufnahmen von Absorptions- bzw. Fluoreszenzspektren Reaktionen mit Halbwertszeiten von 20 bis 30 Minuten verfolgt werden konnten. Die anfallenden Daten wurden nicht gespeichert, ließen sich jedoch über einen Drucker und eine Lochstreifenstanze ausgeben.

Während bei langsamen Umsetzungen die Reaktionspartner durch Schütteln oder Rühren ideal vermischt werden können, müssen bei schnellen Reaktionen "stopped-flow"-

oder "continuous-flow"-Verfahren verwendet werden. Auch muß die Registriergeschwindigkeit wesentlich größer als bei der Untersuchung statischer oder sich langsam ändernder Systeme sein, was den Einsatz spezieller Monochromatoren erforderlich macht. Die Verwendung von Vielkanaldetektoren bedeutet auch hier einen großen Fortschritt, da sie den Wellenlängenvorschub der Monochromatoren überflüssig machen.

Die Zeitkonstanten der zur Datenerfassung nötigen elektronischen Bauteile, wie Verstärker, Wandler u.s.w., müssen natürlich ebenfalls auf die Registriergeschwindigkeit ausgerichtet sein. Außerdem fallen in einem kurzen Zeitraum viele Daten an, die wegen der langen Ansprechzeit von Plottern, Druckern oder Lochstreifenstanzen nicht sofort ausgegeben werden können, sondern zunächst zwischengespeichert werden müssen. Dazu eignen sich Mikroprozessoren besonders gut, denn sie lassen sich auch zur Steuerung der Geräte und zur Weiterverarbeitung der Daten benutzen. Je nach Rechnerkapazität kann auch die Auswertung der Kinetik von ihnen übernommen werden.

2.2. Aufgabenstellung und Abstecken der Teilgebiete

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der Lumineszenz eines sich mit der Zeit ändernden Systems. Als Modell soll die chemilumineszierende Oxidation von Lucigenin in Natronlauge dienen. Die Reaktion kann über die Änderung der Chemilumineszenzintensität und auch fluorimetrisch verfolgt werden, da sowohl die Ausgangsverbindung wie das Endprodukt fluoreszieren. Als Meßgerät dient ein konventionelles Fluoreszenzspektrometer, welches mit einer digitalen Steuer- und Datenerfassungseinheit ausgerüstet werden soll. Die Aufgabe läßt sich in folgende Teilgebiete gliedern:

a) Die Antriebe von Anregungs- und Emissionsmonochromator des Fluoreszenzspektrometers sollen digitalisiert werden. Dazu sind die vorhandenen Synchronmotoren durch Schrittmotoren zu ersetzen. Die Steuerung der Monochromatoren soll von einem Mikroprozessorsystem übernommen werden.

b) Durch Kopplung des Mikrorechners an den A/D-Wandler des Fluorimeters sollen die dort anliegenden Intensitätsdaten vom Mikrorechner übernommen und abgespeichert werden können.

c) Zur Ausgabe der Daten soll der Mikrorechner an eine Lochstreifenstanze, einen Drucker und einen X/Y-Schreiber angeschlossen werden. Die zur Steuerung der Geräte und zur Datenübergabe benötigte Software ist zu erstellen.

d) Es soll ein Algorithmus für die Berechnung von Fluoreszenzspektren einer Komponente aufgestellt werden, wobei innerer Filtereffekt und Reabsorption zu berücksichtigen sind. Nach diesem Algorithmus berechnete Intensitäten sind mit gemessenen Werten zu vergleichen.
Zur Berechnung kinetischer Parameter aus Fluoreszenzdaten müssen die Konzentrationen von Ausgangs- und Endverbindung zu mehreren Zeitpunkten bekannt sein. Der mathematische Ansatz zur Spektrenberechnung ist also zu einem Modell für die Mehrkomponentenanalyse zu erweitern, wobei auch die physikalischen Wechselwirkungen der Komponenten untereinander und die Änderung der Konzentrationen während der Registrierung berücksichtigt werden sollen.

e) Die kinetischen Daten sind aus Chemilumineszenz- und Fluoreszenzmessungen zu bestimmen. Auf Grund der Ergebnisse für verschiedene Anfangskonzentrationen der Reaktionspartner sollten Aussagen über den Reaktionsmechanismus getroffen werden können, der zur Zeit noch umstritten ist.

f) Da die Reaktion durch Kobalt katalysiert wird, soll sie zur quantitativen Bestimmung von Kobaltionen benutzt werden. Hierzu ist eine Analysenvorschrift zu erstellen und die statistischen Kriterien der Methode sind zu bestimmen.

3. Grundlagen der Chemilumineszenz

Manche chemischen Reaktionen ergeben Produkte, die sich in einem elektronisch angeregten Zustand befinden. Findet anschließend ein Übergang des Moleküls in den Grundzustand unter Aussendung von Photonen statt, so nennt man diese Leuchterscheinung Chemilumineszenz. Zusätzlich zur Änderung von Rotations- und Schwingungstermen setzt die Reaktion elektronische Energie frei, man spricht von "kaltem Licht".

3.1. Übersicht chemilumineszierender Reaktionen

Chemilumineszierende Reaktionen sind sowohl in der Gasphase wie in Flüssigkeiten bekannt. Ausführliche Übersichtsartikel wurden von Gundermann (48) und McCapra (49) veröffentlicht.
Schon die einfachste Art einer chemischen Reaktion, der Übergang eines Elektrons von einem Donator zu einem Akzeptor kann unter geeigneten Bedingungen Chemilumineszenz erzeugen. Solche Elektronen-Transfer-Reaktionen (50) sind von großem Nutzen für die Untersuchung höherer Energiezustände, da hier unter definierten Versuchsbedingungen eine große Anzahl angeregter Moleküle generiert werden kann.

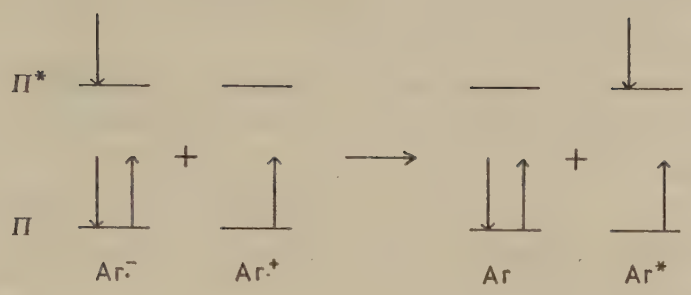


Abb. 3.1: Orbitalschema für eine Elektronen-Transfer-Reaktion

Gelingt es, von einem Molekül ein Radikalkation und ein Radikalanion zu erzeugen, so können beide unter Bildung zweier Neutralmoleküle reagieren, von denen sich eins im elektronisch angeregten Zustand befindet. Das wird in Abbildung 3.1 an einem Orbitalschema für ein aromatisches Molekül Ar verdeutlicht.

Das sich im antibindenden Orbital des Anions befindende Elektron besetzt bei einer Reaktion mit dem Kation auch dessen antibindendes Orbital, von wo aus der Übergang in den Grundzustand unter Lichtemission erfolgt. Denn nach Markus gilt (51), daß die Aktivierungsenergie für den Übergang von einem Zustand in einen gleichartigen geringer ist als für einen Übergang von einem angeregten in den Grundzustand eines anderen Moleküls. Voraussetzung dafür ist, daß die gleichartigen Zustände eine ähnliche Geometrie aufweisen. Deshalb wird Elektronen-Trans-

fer-Chemilumineszenz auch meist bei Anion und Kation desselben Moleküls beobachtet.

Die emittierte Lumineszenz entspricht der Fluoreszenz, wenn das angeregte Molekül, wie in Abb. 3.1 gezeigt, im Singulettzustand entsteht; wird das angeregte Molekül im Triplettzustand gebildet, so läßt sich eine der Phosphoreszenz analoge Emission beobachten, die allerdings in der Regel lichtschwächer ist.

Das bekannteste Beispiel einer Elektronen-Transfer-Reaktion ist die Umsetzung von Anion und Kation des 9,10-Diphenylanthracen, bei welcher Licht ausgestrahlt wird, dessen spektrale Verteilung dem Fluoreszenzspektrum von 9,10-Diphenylanthracen entspricht. Es sind aber auch lumineszierende Reaktionen von Radikalionen verschiedener Molekülarten bekannt. So reagiert ein Rubrenkation mit einem Benzochinonanion unter Bildung eines angeregten Rubrenmoleküls.

Man sollte annehmen können, daß Chemilumineszenzspektren solcher Elektronen-Transfer-Reaktionen immer dem Fluoreszenz- oder Phosphoreszenzspektrum eines der beteiligten Molekülarten entsprechen. Durch konkurrierende Reaktionen wie Excimeren-Bildung oder Zerfall des angeregten Moleküls können aber auch gänzlich andere Spektren beobachtet werden. Außerdem finden auch Energieübertragungen auf andere Moleküle statt.

Die Generierung der Radikalionen wird oft mit elektrochemischen Methoden durchgeführt. Nach Anlegen einer Span-

nung in einer Lösung der zu untersuchenden Substanz(en) bilden sich die Ionen, welche zwischen den Elektroden reagieren. Die Wahrscheinlichkeit der möglichen Konkurrenzreaktionen wird vom benutzten Lösungsmittel beeinflußt, das sich natürlich vom elektrischen Strom nicht zersetzen lassen darf.

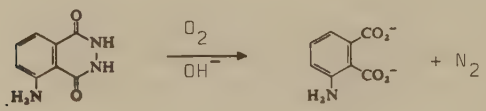
Einige Aromaten, wie Tri(p-tolyl)amin existieren sowohl als Anionen in ihren Alkali-, wie als Kationen in ihren Perchloratsalzen. Mit ihnen kann Elektronen-Transfer-Chemilumineszenz auf chemischem Weg erzeugt werden. Die Oxidation von Anionenradikalen kann auch durch molekularen Sauerstoff geschehen, wobei ebenfalls elektronisch angeregte Moleküle gebildet werden können.

Überhaupt sind die meisten Chemilumineszenzreaktionen Oxidationen, die unter Beteiligung von molekularem Sauerstoff, Ozon oder Wasserstoffperoxid verlaufen. Oft ist es der Sauerstoff selbst, der bei einer Oxidation im angeregten Zustand gebildet wird, wobei zwei rote Linien ((635 nm und 703 nm) zu beobachten sind, was einem Übergang von einem Singulett- in einen Triplettzustand entspricht (52). Das bekannteste Beispiel für diese Reaktionsklasse ist die Umsetzung von Natriumhypochlorit mit Wasserstoffperoxid.

Die Oxidation organischer Moleküle mit molekularem Sauerstoff, Ozon oder Wasserstoffperoxid ergibt häufig Peroxoverbindungen, die unter Emission von Licht zerfallen. Voraussetzung für eine hohe Quantenausbeute

der Chemilumineszenz ist die Entstehung eines fluoreszenzfähigen Zerfallsprodukts in einem angeregten Singulettzustand. Bei einigen in der Natur ablaufenden Reaktionen, wie der Oxidation von Luciferin im amerikanischen Leuchtkäfer (photinus pyralis) werden Quantenausbeuten von 90% beobachtet. Solche natürlichen Leuchterscheinungen werden unter dem Begriff "Biolumineszenz" zusammengefaßt.

Die wichtigste der im Labor gefundenen Chemilumineszenzreaktionen dieser Art ist die alkalische Oxidation von 3-Amino-phthalsäure-hydrazid, "Luminol" (53) unter Bildung von Aminophthalsäure und elementarem Stickstoff.

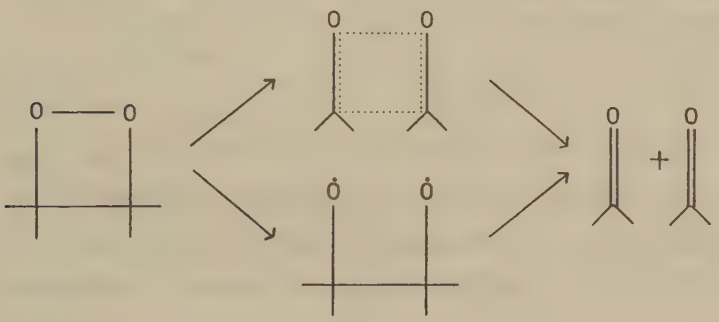


Das Chemilumineszenzspektrum ist mit dem Fluoreszenzspektrum der Aminophthalsäure identisch. Die Reaktion wird durch eine große Zahl von Metallen katalysiert und ist daher auch von analytischem Interesse. Darauf soll später noch eingegangen werden.

Es sind noch eine Reihe chemilumineszierender Reaktionen anderer Hydrazide bekannt und zwar sowohl von cyclischen, wie Luminol, als auch von linearen. Obwohl ihre Mechanismen größtenteils noch nicht vollständig erforscht worden sind, ist doch klar, daß kein einheitlicher Mecha-

nismus für die Hydrazidchemilumineszenz existiert. Wie auch schon bei der Elektronen-Transfer-Chemilumineszenz hängen Reaktionswege und damit auch Quantenausbeuten von der Art der Lösungsmittel und zusätzlich noch von den Oxidationsreagenzien ab.

Viele organische Moleküle, möglicherweise auch einige cyclische Hydrazide, bilden bei der Oxidation 1,2-Dioxetane als Zwischenstufen (54). Sie entstehen z.B. durch Anlagerung von molekularem Sauerstoff an eine Doppelbindung oder durch Reaktion organischer Moleküle mit dem bei der Wasserstoffperoxidzersetzung entstehenden HO_2-Radikal. Zwar sind schon einige stabile Dioxetane isoliert worden, normalerweise zerfallen sie aber bei Raumtemperatur in zwei Carbonylverbindungen, von denen eine im angeregten Zustand entsteht. Dabei werden Reaktionsenthalpien von bis zu 450 kJ/mol (110 kcal/mol) frei. Der Zerfallsmechanismus ist nicht eindeutig geklärt; es kann einerseits ein konzertierter Zerfall gemäß den Woodward-Hoffmann-Regeln vorliegen, andererseits kann auch ein Biradikal als Zwischenstufe auftreten.



Obwohl auf Grund von 'internal conversion' oder 'intersystem crossing' das ursprüngliche Multiplizitätsverhältnis der primär angeregten Moleküle nur schwer zu bestimmen ist, konnte doch bei vielen Dioxetanen eine Bevorzugung des Triplettzustandes für das Carbonyl nachgewiesen werden.
Dioxetane werden auch bei der Oxidation größerer Moleküle als Zwischenstufen angenommen. So soll das schon erwähnte Leuchten der Leuchtkäfer ebenso von der Spaltung eines zyklischen Peroxids herrühren, wie die Chemilumineszenz bei der Oxidation von Acridin- oder Acridanderivaten. Der Mechanismus der Oxidation von Bis-N-methylacridinium-nitrat, Lucigenin, soll in Abschnitt 6 eingehend besprochen werden.

3.2. Theoretische Aspekte

Die Wellenlänge λ des bei einer chemilumineszierenden Reaktion ausgestrahlten Lichts entspricht der freiwerdenden Energie ΔE nach:

$$\Delta E \geq h \cdot \nu \cdot N_L = h \cdot c/\lambda \cdot N_L \qquad (3.1)$$

N_L ist die Loschmidtsche Zahl, h das Plancksche Wirkungsquantum und ν ist die Frequenz des ausgestrahlten Lichts. Um sichtbares Licht zu erzeugen muß die Reaktion zwischen 170 und 330 kJ/mol (40 bis 80 kcal/mol) aufbringen.

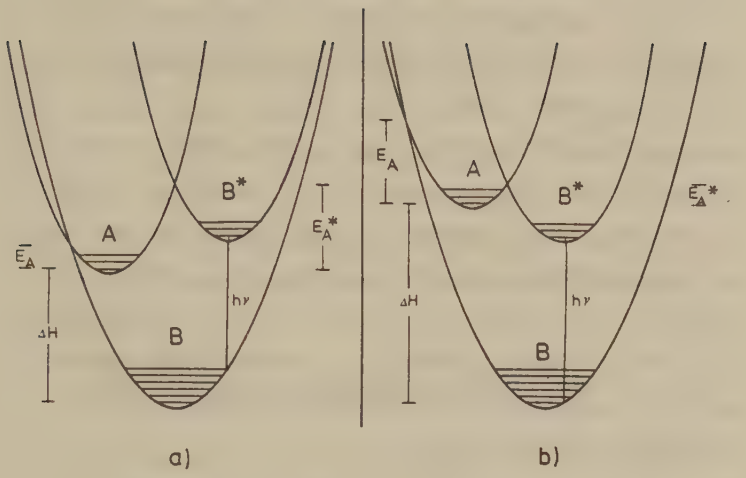


Abb. 3.2: Potentialkurven von Ausgangskomponente A, angeregtem Zwischenprodukt B^* und Endprodukt B einer Reaktion $A \rightarrow (B^* \rightarrow) B$ a) $E_A{}^* > E_A$ b) $E_A > E_A{}^*$

Eine weitere, für die Chemilumineszenz notwendige Voraussetzung wird durch Abbildung 3.2 verdeutlicht. Dargestellt sind die Potentialkurven von Ausgangskomponente A, angeregtem Zwischenprodukt B^* und Endprodukt B einer Reaktion

$$A \rightarrow B$$
$$A \rightarrow B^* \longrightarrow B + h \cdot \nu$$

Dabei wird die Gesamtenergie ΔH freigesetzt. Die Reaktion kann sofort von A nach B verlaufen, oder sie kann zunächst die elektronisch angeregte Zwischenstufe B^* bil-

den, welche anschließend unter Aussendung eines Quants $h \cdot \nu$ nach B übergeht. Die Verteilung der Energie auf unterschiedliche Rotations-Schwingungs-Terme soll hier nicht betrachtet werden.

Welchen Weg eine Reaktion beschreitet, hängt vom Verhältnis der Aktivierungsenergien E_A (A→B) und E_A^* (A→B*) ab. Im Fall a) ist die Aktivierungsenergie für den Übergang nach B kleiner als für den Übergang nach B*, so daß die direkte Umsetzung bevorzugt wird. Im Fall b) ist das Verhältnis umgekehrt, es handelt sich hier um die Energiepotentialdiagramme der Komponenten einer chemilumineszierenden Reaktion.

Der angeregte Zustand B* kann ein Singulett- oder ein Triplett-Zustand sein. Die ausgestrahlte Lumineszenz kann also sowohl der Fluoreszenz wie der Phosphoreszenz entsprechen. Der Phosphoreszenzeffekt basiert auf einem verbotenen Elektronenübergang. Dieser ist in der Regel wesentlich langsamer als der entsprechende Singulett-Singulett-Übergang. Aus diesem Grund ist auch eine grössere Wahrscheinlichkeit für konkurrierende Reaktionen wie 'intersystem crossing' oder strahlungslose Desaktivierung gegeben, was zu einer Verringerung der Lumineszenzintensität führt. Im folgenden soll nur der Singulett-Singulett-Übergang betrachtet werden.

Die Quantenausbeute q_c der Chemilumineszenz berechnet sich zu:

$$q_c = q_a \cdot q_f \qquad (3.2)$$

q_a ist die Wahrscheinlichkeit, daß die Reaktion über den elektronisch angeregten Zustand B^* verläuft. q_f gibt die Quantenausbeute der Fluoreszenz von B an, welche strahlungslose Desaktivierung berücksichtigt. Im Fall a) ist q_a sehr klein, während im Fall b) q_a und damit auch q_c so groß sind, daß eine meßbare Zahl an Photonen pro Zeiteinheit ausgestrahlt wird.
Der als Intensität registrierte Photonenfluß berechnet sich als:

$$I = \frac{\text{Anzahl der ausgestrahlten Photonen}}{\text{Zeiteinheit}} \qquad (3.3)$$

Die bei einer Umsetzung freigesetzten Photonen müssen also in einer genügend kurzen Zeit auf den Empfänger treffen, um dort ein Signal zu erzeugen. Die Aktivierungsenergie, welche die Geschwindigkeitskonstante einer Reaktion bestimmt, darf demnach nicht zu groß sein. Welche Reaktionen sich beobachten lassen, hängt aber auch vom verwendeten Meßsystem und den Meßbedingungen ab. Je größer das bei höchster Verstärkung erreichbare Signal-Rausch-Verhältnis ist, desto mehr Reaktionen, auch mit kleinen Quantenausbeuten oder Geschwindigkeitskonstanten, können photometrisch verfolgt werden.
Eine chemilumineszierende Reaktion läßt sich als eine konsekutive, irreversible Umsetzung ansehen und durch drei Reaktionsgleichungen beschreiben:

$$A \xrightarrow{k_a} B^* \qquad (3.4)$$

$$B^* \xrightarrow{k_f} B + h\cdot\nu \qquad (3.5)$$

$$B^* \xrightarrow{k_Q} B \text{ (+ Wärme)} \qquad (3.6)$$

Während Gleichung 3.4 für die Bildung des elektronisch angeregten Produkts B^* steht, beschreiben die Gleichungen 3.5 und 3.6 die Abreaktion von B^* unter Aussendung eines Quants oder unter strahlungsloser Desaktivierung.

Für die Abnahme der Ausgangskomponente A gilt:

$$-\frac{d[A]}{dt} = k_a \cdot [A] \qquad (3.7)$$

Da Singulett-Singulett-Übergänge wesentlich schneller verlaufen als chemische Umsetzungen, kann angenommen werden, daß k_f und k_Q wesentlich größer als k_a sind. Daher wird das angeregte Zwischenprodukt B^* in demselben Maß verbraucht, wie es gebildet wird. Seine Konzentration läßt sich also als quasistationär ansehen.

$$-\frac{d[B^*]}{dt} = 0 = -k_a \cdot [A] + (k_f + k_Q) \cdot [B^*] \qquad (3.8)$$

$$[B^*] = \frac{k_a}{k_f + k_Q} \cdot [A] \qquad (3.9)$$

Das Produkt B entsteht aus der angeregten Verbindung B^* auf zwei Arten:

$$\frac{d[B]}{dt} = k_f \cdot [B^*] + k_Q \cdot [B^*] = k_a \cdot [A] \qquad (3.10)$$

Die Chemilumineszenzintensität F_c ergibt sich aus der aktuellen Konzentration von angeregten Molekülen als:

$$u \cdot F_c = \frac{d[B^*]_f}{dt} = -k_f \cdot [B^*] \qquad (3.11)$$

$[B^*]_f$ ist die Konzentration an B^*, welche sich nach Gleichung 3.5 umsetzt, während u zur Umrechnung der unterschiedlichen Maßeinheiten dient. Gleichung 3.9 in 3.11 eingesetzt, ergibt:

$$u \cdot F_c = \frac{k_f \cdot k_a}{k_f + k_Q} \cdot [A] \qquad (3.12)$$

Wird nach [A] aufgelöst, so folgt:

$$[A] = \frac{k_f + k_Q}{k_f \cdot k_a} \cdot u \cdot F_c \qquad (3.13)$$

Die Ableitung nach der Zeit ergibt:

$$\frac{d[A]}{dt} = \frac{k_f + k_Q}{k_f \cdot k_a} \cdot u \cdot \frac{dF_c}{dt} \qquad (3.14)$$

Aus den Gleichungen 3.7 und 3.13 folgt aber auch:

$$-\frac{d[A]}{dt} = k_a \cdot \frac{k_f + k_Q}{k_f \cdot k_a} \cdot u \cdot F_c \qquad (3.15)$$

Ein Vergleich von 3.14 und 3.15 ergibt:

$$-\frac{dF_c}{dt} = k_a \cdot F_c \qquad (3.16)$$

Die Abnahme der Chemilumineszenzintensität wird für diese Reaktion also durch dieselbe Geschwindigkeitskonstante bestimmt wie die Abnahme der Ausgangskomponente und die Zunahme des Endprodukts. Deshalb können Chemilumineszenzmessungen auch zur Bestimmung von Geschwindigkeitskonstanten herangezogen werden.

Im allgemeinen sind bei einer chemilumineszierenden Reaktion mehrere Partner beteiligt, so daß sich ein Ver-

lauf höherer Ordnung ergibt. Liegen aber alle Komponenten bis auf eine im Überschuß vor, so kann man ihre Konzentrationen als konstant ansehen, und die Reaktionsgeschwindigkeit wird nur durch die Abnahme dieser einen Komponente bestimmt. Es handelt sich dann um eine Reaktion Quasi-1.-Ordnung. Die Konzentrationen der im Überschuß vorliegenden Komponenten gehen als konstante Werte in die Geschwindigkeitskonstante ein, so daß obige Ableitung auch für diesen Fall gilt, allerdings mit einer modifizierten Konstanten k_a'. Durch Variation der konstanten Konzentrationswerte kann die Abhängigkeit der Chemilumineszenz von allen beteiligten Reaktionspartnern bestimmt werden.

3.3.. . Analytische Anwendung der Chemilumineszenz

Die Identifizierung der lumineszierenden Spezies einer Reaktion gelingt zumeist durch Vergleich der Chemilumineszenzspektren mit Fluoreszenzspektren möglicher Zwischen- oder Endprodukte. Leider hat man es aber oft mit Überlagerungen verschiedener Spektren zu tun, weil das primär angeregte Molekül Energie auf andere Komponenten überträgt.

Die Chemilumineszenzintensität ist, wie bereits gezeigt wurde, zu Beginn der Reaktion am höchsten. Gleichzeitig ist die Reaktionsgeschwindigkeit dann aber am größten.

Um zu vermeiden, daß sich die Konzentrationen während des Scans merklich ändern und so die Spektren verfälschen, ist es also vorteilhaft, Spektren möglichst schnell zu erfassen. Während dazu heute Vielkanaldetektoren zur Verfügung stehen (55), konnten früher nur durch mechanische Veränderungen an herkömmlichen Monochromatorantrieben die Scanzeiten verringert werden. So untersuchten Gundermann u.a. (56) die Chemilumineszenzspektren verschiedener Hydrazide mit einem von Bergmann entwickelten Monochromatorantrieb, bei dem eine Schubstange, die von einer Kurvenscheibe angetrieben wurde, das dispersive Element, hier ein Prisma, bewegte. Dadurch konnten cyclisch Spektren gemessen werden, wodurch sich Scanzeiten von weniger als einer Sekunde erreichen ließen (57).

Für die quantitative Analyse gewinnen die chemilumineszierenden Reaktionen im Rahmen der katalytischen Analysenverfahren immer mehr an Bedeutung. Der apparative Aufwand ist hier sehr gering, da nur eine lichtdurchlässige Mischkammer und ein Detektor benötigt werden. Für Routinemessungen werden Continuous-flow-Systeme benutzt. Auf ein dispersives Element kann im Normalfall verzichtet werden, weil sich die Reaktion auch an Hand der Änderung der Gesamtemission verfolgen läßt. Katalysatoren steigern hier nicht nur die Reaktionsgeschwindigkeit, wie bei anderen Reaktionen auch, sondern auch die Intensität, denn pro Zeiteinheit treffen mehr

Photonen auf den Empfänger. Da zumeist ein linearer Zusammenhang besteht, kann nach Eichung eine quantitative Analyse der Katalysatorkonzentration sowohl aus der Geschwindigkeitskonstanten, wie aus der Maximalintensität erfolgen (58). Die Auswertung der Maximalintensität wird dabei bevorzugt, da sie ohne weitere Berechnung aus der Messung bestimmt werden kann.

In Flüssigkeiten werden chemilumineszierende Reaktionen zumeist zur Analyse von Metallspuren benutzt (59), aber auch Oxidationsmittel, wie Wasserstoffperoxid oder Halogene lassen sich quantitativ bestimmen. Dabei werden Nachweisgrenzen von bis zu 10^{-10} mol/l erreicht (60). Es sind eine Reihe von Reaktionssystemen bekannt, welche unter definierten Reaktionsbedingungen selektiv für eine bestimmte Gruppe von Katalysatoren sind (61). Die am häufigsten benutzte Reaktion ist die Oxidation von Luminol, die sich durch besondere Empfindlichkeit für die Nachweise auszeichnet.

Wie schon erwähnt wurde, sind auch chemilumineszierende Reaktionen von Gasen bekannt. Sie lassen sich zur Bestimmung von Luftverunreinigungen benutzen, indem die Verunreinigungen mit geeigneten gasförmigen Partnern zur Reaktion gebracht werden. Die ausgestrahlte Lichtintensität ist dann proportional dem Umsatz der Reaktion. Es sind Verfahren für alle gängigen Schadstoffe in der Luft bekannt, wobei besonders die Nachweise von Stickoxiden und Ozon große Bedeutung erlangt haben. Die Nachweisgrenzen liegen im ppb-Bereich (62).

4. Aufbau eines digitalen Steuerungs- und Datenerfassungssystems

Die Verfolgung einer chemischen Reaktion wird am einfachsten durch die Registrierung eines einer Leitkomponente proportionalen Signals durchgeführt, z.B. durch die Beobachtung der Extinktion bei einer Wellenlänge über die Zeit. Ist keine nur für die Leitkomponente spezifische Eigenschaft bekannt, so kann die Information über ihre Zu- oder Abnahme durch eine Kombination von Signalen erhalten werden, z.B. durch die zeitliche Verfolgung der Extinktionen bei mehreren Wellenlängen oder auch durch die Registrierung ganzer Spektren gegen die Zeit. Dabei muß die zeitliche Differenz je zweier Spektren bekannt sein. Die Auswertung der graphisch gespeicherten Daten zum Zweck der Weiterverarbeitung ist natürlich äußerst mühsam, und es läßt sich auch nur eine begrenzte Genauigkeit erreichen. Deshalb ist es zweckmäßig, die Daten digital zu erfassen und abrufbar abzuspeichern. Die Zeitachse läßt sich dabei durch die Adressen der Speicherplätze darstellen. Die Erweiterung eines konventionellen Fluoreszenzspektrometers mit einer digitalen Steuer- und Datenerfassungseinheit soll hier beschrieben werden.

4.1. Beschreibung des vorhandenen Meßsystems

Zur Durchführung der Arbeit stand ein älteres Aminco-Bowman-Spectrophotofluorometer [+)] zur Verfügung. Der prinzipielle Aufbau ist in Abbildung 4.1 wiedergegeben:

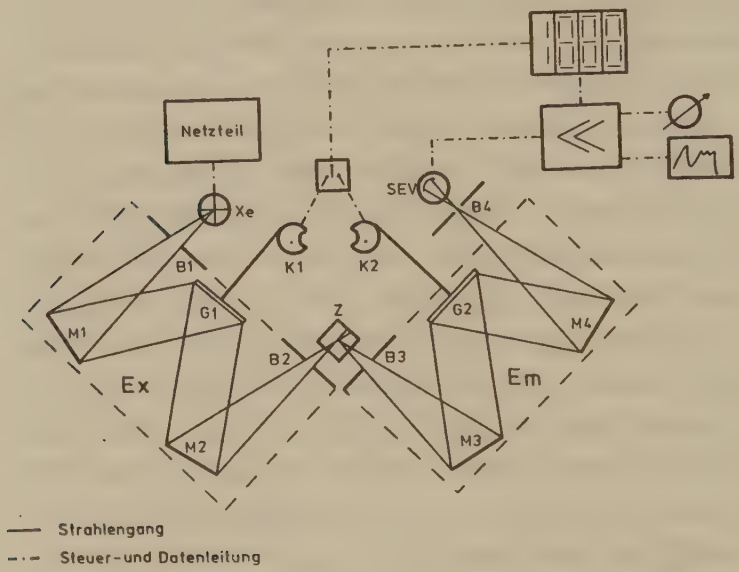


Abb. 4.1: Aminco-Bowman Spectrophotofluorometer
(Erklärung der Symbole im Text)

Eine Xenon-Hochdrucklampe Xe (150 W) [++)] liefert ein Kontinuum im Bereich von 200-800 nm. Durch den Anregungsmonochromator Ex, bestehend aus den Spiegeln M1 und M2, so-

---

+) American Instrument Co., Inc., Silver Springs, Md. (USA)
++) Osram, Berlin u. München; Typ XBO 150 W/2

wie dem Gitter G1 (600 Linien/mm) wird das Licht der Quelle spektral zerlegt und auf die Mitte der Meßzelle Z fokussiert, wobei die spektrale Bandbreite durch ein System von Blenden B1 und B2 bestimmt wird. Das unter 90° aus der Meßzelle austretende Fluoreszenzlicht wird durch den Monochromator Em (Spiegel M3 und M4, Gitter G2, Blendensystem B3 und B4) spektral zerlegt, und Licht der eingestellten Wellenlänge wird auf den Sekundärelektronenvervielfacher SEV (1P28) abgebildet. Das elektrische Signal wird einem Differenzverstärker zugeführt. Es läßt sich auf einer analogen Anzeige ablesen und mit einem Schreiber registrieren. Zur Ergänzung wird parallel dazu die am Verstärkerausgang anliegende Spannung auf einen A/D-Wandler mit Digitalanzeige +) gegeben. Die Empfindlichkeit der Anzeigen läßt sich durch Potentiometer variieren.

Beide Monochromatoren sind in der ursprünglichen Anordnung mit Synchronmotoren ausgerüstet, die über Rutschkupplungen die Kurvenscheiben K1 und K2 antreiben. Damit fest verbunden ist je eine Scheibe zum Ablesen der Wellenlänge. Die Kurvenscheiben treiben über Schubstangen die Bewegungen der Gitter G1 und G2 so an, daß sich eine lineare Beziehung zwischen Drehwinkel und Wellenlängen ergibt. Der Spektralbereich von 200-800 nm umfaßt dabei eine Rotation um 300°, während das Zurückfahren der Gitter in die Ausgangsstellung durch die Dre-

---

+) Philips, Eindhoven; Typ PM 2494

hung um die restlichen 60° bewirkt wird. Bei der Aufnahme mehrerer Spektren hintereinander ist es also nicht nötig, jeweils auf die Anfangswellenlänge zurückzufahren, es kann eine feste Drehrichtung der Monochromatoren beibehalten werden. Die Wellenlängenrichtigkeit wird vom Hersteller mit ± 2 nm angegeben. Auf den Drehachsen beider Monochromatoren sitzen Folgepotentiometer, deren Ausgangsspannungen wahlweise auf dem o.g. Digitalvoltmeter abzulesen sind und so eine genauere Kontrolle der eingestellten Wellenlänge ermöglichen. Sie lassen sich auch zum Antrieb der X-Achse eines X/Y-Schreibers verwenden. Die Drehgeschwindigkeit der Synchronmotoren läßt sich durch ein Potentiometer regeln, wobei jedoch immer nur ein Motor laufen kann.

Mit der siebenstufigen Verstärkereinheit läßt sich ein maximaler Umschaltbereich von 1:1000 erreichen. Auf ihr Rauschen wird später eingegangen werden. Die Zeitkonstante wird vom Hersteller nicht angegeben. Sie ist jedoch kleiner als die Wandelrate des 3 1/2-stelligen-A/D-Wandlers der Digitalanzeige von 12,5/s. Die maximal wandelbare Spannung liegt bei 20 V. Die digitalen Werte liegen mit einigen Steuersignalen BCD-codiert am Ausgang an.

4.2. Erweiterung des Systems zur digitalen Erfassung von Fluoreszenzdaten

Der Ausbau des Gerätes zu einem digitalen Steuerungs- und Datenerfassungssystem wurde in zwei Stufen durchgeführt. Eine zunächst aufgebaute Hardware-Ansteuerlogik zum Anfahren bestimmter Wellenlängen wurde später durch ein Mikroprozessorsystem ergänzt, welches nicht nur die Steuerung der Monochromatorantriebe, sondern auch die Datenerfassung übernahm.

4.2.1. Aufbau der Hardware-Ansteuerlogik für Wellenlängen

Es wurde eine Ansteuerlogik für die Monochromatoren entwickelt, die es gestattete, wählbare Wellenlängen gezielt anzufahren. Hieraus ergeben sich Vorteile für Fluoreszenzmessungen bei diskreten Anregungs- bzw. Emissionswellenlängen, wie sie bei der Vermessung eines Standards oder auch bei der Verfolgung einer einfachen Reaktion durchgeführt werden. Zur Datenerfassung wurde die vorhandene Anordnung benutzt.
Zunächst wurden die für den Wellenlängenvorschub zuständigen Synchronmotoren durch Schrittmotoren ersetzt. Die Wahl der Kombination von Motor und Getriebe wurde durch zwei Faktoren beeinflußt. Zum einen mußte das Anlaufdreh-

moment für den Monochromatorantrieb von 7 Ncm aufgebracht werden. Gleichzeitig sollten Motor und Getriebe eine vernünftige Auflösung des Wellenlängenvorschubs gewährleisten. Beide Bedingungen wurden erfüllt durch Kombination eines Motors [+)] mit dem Schrittwinkel von 7,5° mit einem Getriebe, welches 3:250 untersetzt. Daraus ergeben sich 4000 Schritte pro Umdrehung. Da ein Spektrum von 200-800 nm einer Drehung der Achse um 300° entspricht, wird eine Auflösung von 0,18 nm pro Schritt erreicht. Bei einem Wirkungsgrad von 0,51 reduziert das Getriebe das Anfahrdrehmoment auf 0,165 Ncm. Laut Werksangabe resultiert aus einer solchen Last eine maximale Anlaufdrehzahl des Motors von 350 Schritten pro Sekunde, sie liegt damit wesentlich höher als in der Praxis benötigt.

Die Schrittmotoren wurden mit einer Ansteuerungselektronik ausgestattet (Netzteil,Oszillator,Steuerschaltung und Kompensationsnetzwerk). Da jeweils nur ein Wellenlängenvorschub bewegt wird, genügte ein Satz der Ansteuerbauteile, dessen Ausgänge über ein Relais wahlweise auf einen der beiden Motoren geschaltet werden konnten.[++)]

Das zum Anfahren definierter Wellenlängen benötigte Interface ist in Abbildung 4.2 für die Steuerung eines Monochromators dargestellt.

+) Valvo GmbH, Hamburg, Typ ID 07

++) Herrn Ing.grad R. Singer und Herrn U. Spitz möchte ich an dieser Stelle herzlich für ihre Unterstützung beim Bearbeiten der elektronischen Probleme danken.

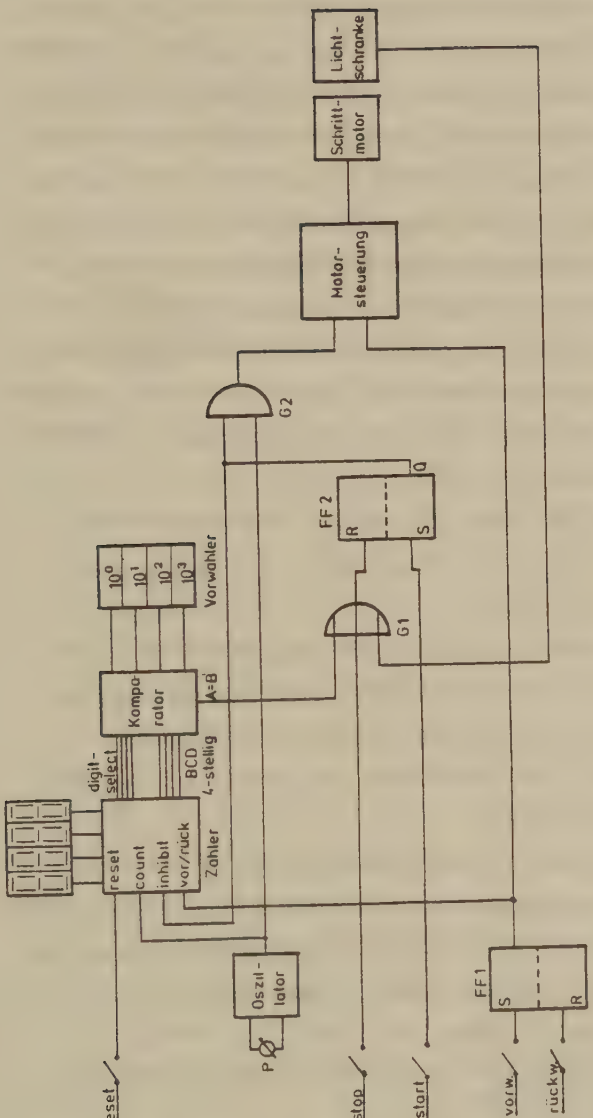


Abb. 4.2: Ansteuerlogik eines Monochromators

Mit den Flip-Flops FF1 und FF2 werden die Betriebsarten Vorwärts und Rückwärts, sowie Start und Stop ausgewählt. Das Potentiometer P dient der Einstellung des zeitlichen Impulsabstandes und damit der Motorgeschwindigkeit. FF2 läßt die vom Oszillator permanent ausgesendeten Impulse am Gatter G2 entweder zum Motor passieren oder blockiert sie. Damit gekoppelt ist der Zählmechanismus. Der Schrittzähler ist ein vierstelliger Zählbaustein ZN 1040 E [+)], dessen 'inhibit'-Eingang von FF2 beschaltet wird. Die Zählrichtung wird, ebenso wie die Drehrichtung des Motors, durch FF1 bestimmt. Zur Ablesung wird der aktuelle Wert des Zählers auf eine vierstellige Sieben-Segment-Anzeige übertragen.

Die Einstellung einer definierten Anfangswellenlänge für jeden Monochromator geschieht mit Hilfe je einer Reflexionslichtschranke [++)]. Diese sind unterhalb der Monochromatoren fest am Gehäuse angebracht und reagieren auf einen mit der Wellenlängenscheibe mitlaufenden Reflektor. Beim Ansprechen der Lichtschranke wird FF2 zurückgesetzt, was die Drehung des Motors und den Zählvorgang unterbricht.

Eine Komparatorschaltung ermöglicht es, den Motor eine beliebige Anzahl von Schritten ausführen zu lassen, welche auf einem vierstelligen dekadischen Vorwähler eingegeben werden kann. Das Prinzip dieser Schaltung soll im

---

+) Ferranti Electronic Components Division, Gem Mill, Chadderton, Oldham

++) Optron Inc., Typ OPB 730 über Fa. Neumüller, Taufkirchen

folgenden dargestellt werden:
Die vier dezimalen Stellen des Zählers liegen, von einem internen Taktgeber gesteuert, zyklisch an den vier BCD-Ausgängen des Zählers an. Im gleichen Rhythmus werden 'digit-select'-Ausgänge synchron mit den dazugehörigen Dezimalziffern gesetzt. Mit jedem dieser 'digit-select'-Signale werden je 4 von insgesamt 16 D-Flip-Flops geschaltet, an denen die BCD-codierte Information anliegt. Nach Durchlaufen eines Zyklus sind hierdurch 4 BCD-Stellen (zu je 4 Bit) an den Ausgängen der D-Flip-Flops abgreifbar und können über 4 Komparatoren mit den an den Vorwählern eingestellten Werten verglichen werden. Stimmen alle 16 Kanäle (4 Dezimalstellen) überein, so wird FF2 zurückgesetzt.

4.2.2. Ausbau der Apparatur zu einem On-line Steuerungs- und Datenerfassungssystem mit Hilfe eines KIM 1-Mikrorechners

Die Erweiterung des Systems zu einer Steuer- und Datenerfassungseinheit wurde durch Ankoppeln eines Mikrorechners an die oben beschriebene Hardware-Schaltung realisiert. Die Datenerfassung erfolgt direkt vom A/D-Wandler der Digitalanzeige. Außerdem besteht die Möglichkeit, die gesammelten Daten über Peripheriegeräte wie Drucker, X/Y-Schreiber oder Lochstreifenstanze auszuge-

ben. Zur Erfüllung dieser Aufgaben wird ein KIM-1-Mikroprozessorsystem [+] benutzt.

KIM-1 ist ein Mikroprozessorsystem, welches auf der Zentraleinheit MCS 6502 basiert (63). Das Betriebssystem ist in 2 K-Byte ROM gespeichert. In der benutzten Ausbaustufe stehen 17 K-Byte RAM zur Verfügung, die über den 8-Bit-Datenbus angesprochen werden können. Die Eingabe der Daten erfolgt hexadezimal über ein Tastenfeld. Die jeweils angesteuerte Adresse und ihr Inhalt werden auf einer 7-Segment-Anzeige dargestellt.

Ein serienmäßig vorhandenes Interface erlaubt den direkten Anschluß eines konventionellen Kassettenrecorders an das System, was die zeitlich nicht begrenzte Speicherung von Programmen und Daten ermöglicht.

Zur seriellen Datenübertragung dient eine 20 mA-Schnittstelle. Neben einer Eingabe-Tastatur mit Drucker ist hierüber auch ein Anschluß an das Rechnersystem des Lehrstuhls [++] vorgenommen worden, das allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht benutzt worden ist.

Der parallele Datentransfer des Systems mit dem Fluorimeter, sowie mit einer Lochstreifenstanze und einem X/Y-Schreiber als weiteren Peripheriegeräten, erfolgt über 2 I/O-Puffer mit zusammen 15 Ein/Ausgängen, wobei die Richtung des Datentransfers softwaremäßig gesteuert werden kann.

+) MOS Technology, Inc., Norristown

++) Digital Equipment Corporation, Maynard (Mass.)
Typen PDP 11/03 und PDP 11/34

Zur Generierung definierter Zeitintervalle für kinetische Messungen wurde ein externer Timer-Baustein an das System angeschlossen. Dieser gibt zyklisch, jeweils nach Ablauf der vorgewählten Zeit, einen Impuls aus. Dadurch wird ein Interrupt erzeugt, was den Mikrorechner zur Aufnahme eines neuen Meßwertes oder auch Spektrums veranlassen kann.
Das nach Anschluß des Mikrorechners und der dazugehörigen Peripheriegeräte erweiterte Meßsystem ist in Abbildung 4.3 schematisch dargestellt.

Software-Spezifikationen

Die bei der Ausführung von Befehlen notwendige Steuerung der Einzeloperationen wird von einem Taktgenerator mit der Frequenz 1 MHz übernommen. Die Ausführung eines Befehls benötigt zwischen 2 und 7 Zyklen, d.h. die Zeitdauer beträgt 2 bis 7 µs. Zur Kontrolle der verschiedenen Operationen dient das Status-Register, welches die Status-Bits, wie Carry, Overflow, Negativ oder Zero anzeigt. Mit seiner Hilfe läßt sich auch der Interrupt aktivieren oder desaktivieren. Durch Setzen des Dezimal-Bits wird erreicht, daß alle arithmetischen Operationen im Dezimalmodus, und nicht, wie sonst üblich, im hexadezimalen Modus ausgeführt werden.

Herrn Dipl. Chem. W. Liekmeier, der ebenfalls mit dem KIM-1-Mikrorechner arbeitete, möchte ich herzlich für die gute Zusammenarbeit bei der Lösung aller mit dem Aufbau des Systems zusammenhängenden Probleme danken.

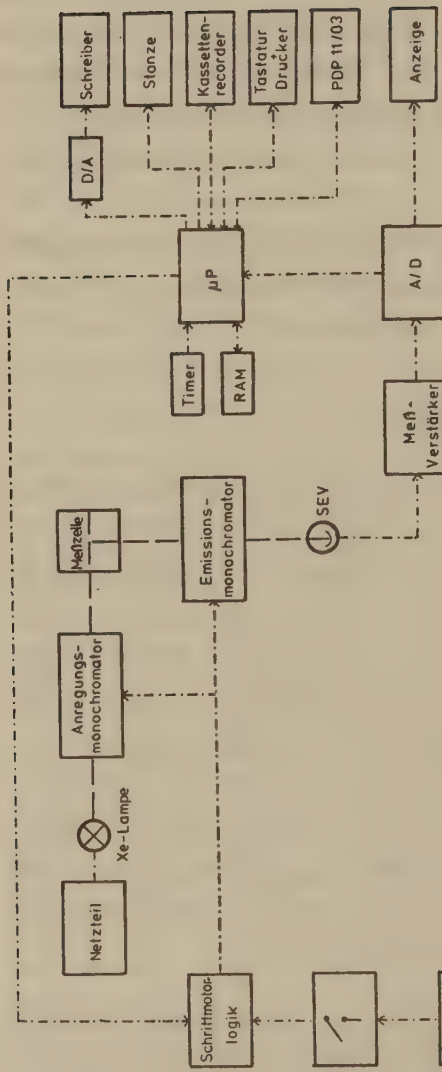


Abb. 4.3: Blockschaltbild der Meßapparatur

4.2.3. Beschreibung der Steuerung, Datenaufnahme und -ausgabe

Die Hauptaufgabe des Mikrorechners ist die Datenübertragung von oder zu Peripheriegeräten einschließlich des Fluorimeters. Dabei erfolgt die Kommunikation im 'hand-shaking'-Verfahren. Das bedeutet, daß nicht nur reine Daten übertragen werden, sondern auch eine Steuerung dieses Vorgangs über bestimmte Impulse bei der seriellen Übertragung, bzw. über separate Steuerleitungen bei der Parallelübertragung erfolgt.
Das Prinzip der Steuerung oder Datenübertragung ist zwischen Mikrorechner und allen Peripheriegeräten etwa gleich. Auch alle dazu benutzten Programme sind ähnlich, deshalb soll hier exemplarisch die Registrierung von Fluoreszenzspektren und das dazugehörige Meßprogramm ausführlich beschrieben werden. Anschließend wird auf Unterschiede bei der Benutzung der anderen Peripheriegeräte hingewiesen werden.

Belegung der I/O-Ports bei der Kopplung Mikrorechner-Fluorimeter

Die 15 zur Verfügung stehenden Ein/Ausgänge werden folgendermaßen eingeteilt:
12 Eingänge dienen zur Erfassung der BCD-codierten Einer, Zehner und Hunderter des Digitalvoltmeters. Ein 13. Eingang übernimmt das 'busy-Signal' des A/D-Wandlers, wel-

ches während der 20 ms dauernden Integrationsperiode gesetzt ist. Es bleibt 60 ms zurückgesetzt, worauf die nächste Integration beginnt. Während der Gesamtzeit von 80 ms, was einer Wandelrate von 12,5 Hz entspricht, wird der gewandelte Wert auf der Anzeige dargestellt.

Über die 14. als Ausgang geschaltete Transfer-Leitung werden vom Mikroprozessor erzeugte Impulse auf Zähler und Steuerlogik der Motoren gegeben.
Der 15. Ein/Ausgang kann zur softwaremäßigen Steuerung des Umschaltrelais der Monochromatorantriebe dienen. Das bringt Vereinfachungen bei der Aufnahme einer EEM mit sich.

Datenübernahme und -speicherung

Da das KIM1-System wahlweise mit hexadezimalen und dezimalen Daten rechnen kann, wurden die vom A/D-Wandler übernommenen, BCD-codierten Daten nicht gewandelt. Das bringt den Vorteil einer größeren Übersichtlichkeit mit sich. Allerdings wird der dynamische Bereich der Speicher nicht voll genutzt. Während sich in einem 16-Bit-Speicher binärcodierte Zahlen bis zu 65535 speichern lassen, beträgt die höchste speicherbare BCD-codierte Zahl 9999. Da vom A/D-Wandler Daten mit Größen bis zu 999 übernommen werden können, sind also 10 Akkumulationen möglich.

Registrierung von Spektren

Die Anfangswellenlänge der Spektren wird mit Hilfe der im vorigen Abschnitt beschriebenen Komparatorschaltung angefahren. Nach Abkoppeln des zur Schrittmotorlogik gehörigen Oszillators übernimmt der Mikrorechner die Generierung der Antriebsimpulse.
Der Mikrorechner liest an jeder Meßstelle eines Spektrums den Intensitätswert bis zu 10 mal, wobei er immer eine neue Wandlung des Digitalvoltmeters abwartet, und addiert die Werte in einen Hilfsspeicher. Die Daten werden anschließend hintereinander auf jeweils 2 Speicherzellen abgelegt.
Dann wird die nächste Wellenlänge angefahren, indem eine vorgegebene Anzahl von Impulsen auf die Schrittmotorlogik gegeben wird. Die Frequenz der Impulse und damit die Drehgeschwindigkeit wird über Zählschleifen gesteuert.
Nach Registrierung eines Spektrums, d.h. wenn eine bestimmte Anzahl von Datenpunkten gemessen und abgespeichert ist, fährt der Monochromator wieder auf die Anfangswellenlänge vor. Die dazu notwendige Anzahl von Impulsen ergibt sich aus der Differenz zwischen der Schrittzahl des Spektrums und 4000, weil diese Zahl einer vollen Umdrehung der Antriebsscheibe entspricht.
Ist die vorgegebene Anzahl von Spektren noch nicht registriert, so springt das Programm in eine Warteroutine,

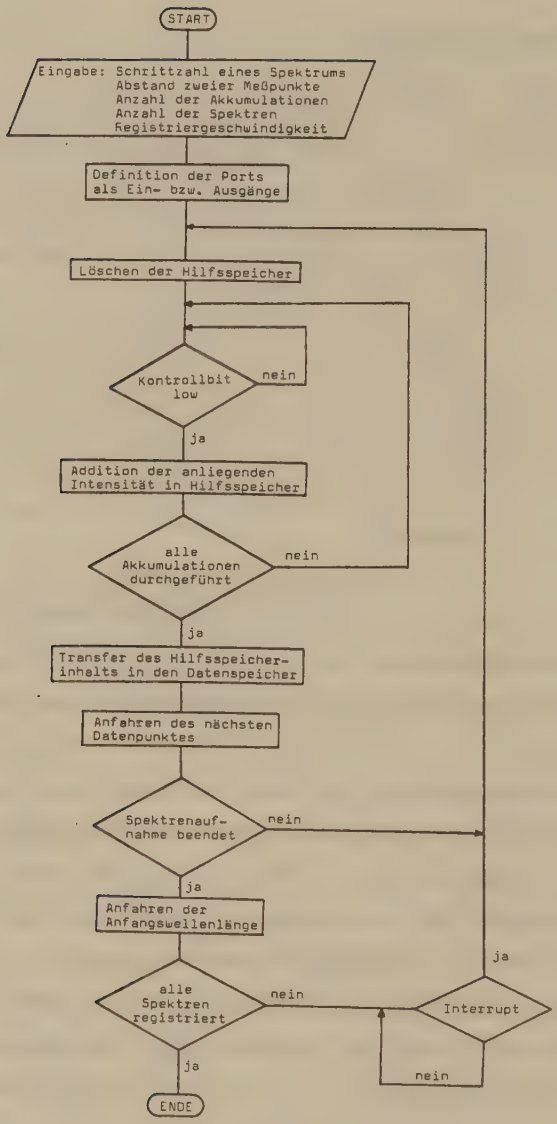


Abb. 4.4: Ablaufschema des Meßprogramms

bis ein Interrupt des Zeitgebers einen neuen Scan auslöst. Die Spektren werden hintereinander abgespeichert, wobei jeweils ein Abstand von einigen Plätzen gelassen wird. Nach Beendigung aller Aufnahmen meldet sich das Betriebssystem zurück. Ein Blockdiagramm des Programmablaufs ist in Abbildung 4.4 dargestellt.
Zur Registrierung einer kinetischen Kurve bei einer Wellenlänge wird der Interruptgeber nicht benötigt. Zur Datenaufnahme wurde ein Programm entwickelt, welches nach jeder Datenübernahme eine Zählschleife von der Dauer einer Zehntelsekunde so oft durchläuft, wie es vorgegeben wird. Dadurch haben die registrierten Intensitäten einen definierten zeitlichen Abstand, so daß sich eine kinetische Auswertung durchführen läßt.

Kopplung Mikrorechner-Lochstreifenstanze

Zur Übergabe der gespeicherten Daten auf das Steuergerät der Lochstreifenstanze steht nur eine Datenleitung von 8 Bit zur Verfügung. Allerdings verfügt das Steuergerät über einen 8-Bit-Speicher. Zur Ausgabe von 16-Bit-Daten auf Lochstreifen werden 3 Steuersignale benötigt. Zunächst wird das erste Byte der Information an den Ausgang des Mikrorechners gelegt. Nach Ausgabe eines Impulses wird es von der Stanze übernommen und gespeichert. Anschließend wird der I/O-Port mit dem zweiten Byte belegt. Ein Impuls auf der zweiten Steuerleitung bewirkt

die Übernahme und das Stanzen dieses Bytes. Das abgespeicherte Byte wird anschließend gestanzt. Es müssen also zunächst immer Einer und Zehner und danach Hunderter und Tausender übergeben werden, damit die Ziffern einer Zahl in der richtigen Reihenfolge auf dem Lochstreifen erscheinen. Durch eine Hardware-Logik des Steuergerätes lassen sich Trennzeichen zwischen die 4-stelligen Zahlen, sowie Bitmuster für "Wagenrücklauf" und "Zeilenvorschub" einfügen.
Während des Stanzvorgangs setzt das Steuergerät das dritte Kontrollbit. Der Mikrorechner muß also mit der Übergabe der nächsten Zahl so lange warten, bis es wieder zurückgesetzt worden ist.

Kopplung Mikrorechner-X/Y-Schreiber

Zur Ausgabe der Daten auf einem X/Y-Schreiber muß jeder Intensität ein Vorschub in X-Richtung zugeordnet werden. Das geschieht über eine Zählschleife. Zur Darstellung eines Punktes werden X- und Y-Wert nacheinander in die Ausgangsports geschrieben und nach Aktivieren über je ein Steuersignal auf zwei 12-Bit D/A-Wandler gegeben. Diese legen die zur Steuerung erforderlichen Spannungen an den Schreiber. Da D/A-Wandler nur binäre Zahlen umsetzen, müssen die BCD-codierten Zahlen zunächst gewandelt werden. Dabei wird ein 16-Bit-Wort auf 14 Bit reduziert. Zweimaliges Rechtsshiften ergibt die für die

Wandler geeignete Größe. Die durch dieses Programm erhaltenen Darstellungen sind natürlich in ihrer Form und Größe abhängig von den am Schreiber selbst eingestellten Empfindlichkeiten.
Das noch freie 15. Bit des I/O-Puffers dient zur Steuerung eines Relais , welches die Feder hebt oder senkt. Auf diese Weise lassen sich auch mehrere Spektren fortlaufend in ein Bild zeichnen, wobei die Bewegung vom Endpunkt des einen zum Anfangspunkt des folgenden Spektrums mit gehobener Feder durchgeführt wird.

Serieller Datentransfer

Der Transfer serieller Daten wird bei Betrieb des Drukkers und bei der Kommunikation mit dem Lehrstuhlrechner durchgeführt. Hier erfolgt die Steuerung über Bitmuster, die der eigentlichen Datenübertragung vor- oder nachgeschaltet sein müssen. Das Umsetzen der binär gespeicherten in serielle Daten und umgekehrt wird vom Betriebssystem des Mikrorechners vorgenommen, wobei softwaremäßig unterschiedliche Übertragungsraten eingestellt werden können.

4.3. Geräteparameter

4.3.1. Eichung der Monochromatoren

Vor der Eichung der Monochromatorsteuerungen auf Nanometerbasis erschien es zunächst sinnvoll, die Anfahrgenauigkeit der Lichtschranken zu ermitteln. Dazu wurden die Lichtschranken mehrmals angefahren, und die für eine Umdrehung benötigte Anzahl an Schritten wurde gezählt. Aus den Abweichungen der gemessenen Zahlen vom Mittelwert, der theoretisch bei 4000 Schritten pro Umdrehung liegen sollte, ließen sich die Standardabweichungen der Anfahrgenauigkeiten berechnen. Um die Abhängigkeit der statistischen Ergebnisse von der Rotationsgeschwindigkeit zu ermitteln, wurden die Messungen bei 3 verschiedenen Einstellungen der Steuerpotentiometer für die Impulsabstände durchgeführt. Es ergaben sich bei je 12 Einzelmessungen:

	Anregungsmonochromator			Emissionsmonochromator		
Zeit/U [s]	8	34	60	8	34	60
Mittelw.	4000,2	4000,3	4000,0	3999,5	4000,0	4000,0
St.-abw.	0,58	1,23	0,60	1,93	1,71	2,09

Tabelle 4.1: Mittlere Schrittzahlen und Standardabweichungen für eine Umdrehung von Anregungs- und Emissionsmonochromator

Die Mittelwerte liegen sehr nahe beim Erwartungswert. Obwohl die Ausrüstung beider Monochromatoren identisch ist, ist die Streuung für den Anregungsmonochromator kleiner als für den Emissionsmonochromator. Dieses kann elektronische Ursachen haben, z.B. Störimpulse, oder auch an Unterschieden in der Ansprechempfindlichkeit der Lichtschranken liegen. Es wurde allerdings nicht weiter verfolgt, weil auch eine Standardabweichung von etwa 2 Schritten, das entspricht 0,36 nm, als befriedigend angesehen werden konnte.

Aus den Ergebnissen ist ebenfalls ersichtlich, daß keine Abhängigkeit der Anfahrgenauigkeit von der Drehgeschwindigkeit vorliegt.

Die Werte der Tabelle 4.1 wurden im Vorwärtsbetrieb erhalten. Der Rückwärtsbetrieb ergibt ähnliche Ergebnisse. Die Umstellung der Drehrichtung während einer Messung oder während des Anfahrens eines vorgewählten Punktes ist jedoch nicht sinnvoll, weil die Getriebelose von ca. 8 Schritten eine zusätzliche Streuung bewirkt. Aus diesem Grund wurden alle Messungen und Einstellungen im Vorwärtsbetrieb vorgenommen.

Zur Kalibrierung der Monochromatoren wurden die Umrechnungsfunktionen zwischen Schritten und Wellenlängen ermittelt. Den Signalen der beiden Reflektoren wurde dabei die Schrittposition 0 zugeordnet.

Der Emissionsmonochromator ließ sich mit einer Quecksilberlampe kalibrieren, die an Stelle einer Küvette im

Probenraum plaziert wurde. Ausgehend vom Signal des Reflektors wurden die Lagen der Quecksilberlinien ermittelt. Auf Grund der hohen Meßpunktdichte und des geringen Intensitätsrauschens ließen sich die Lagen der Intensitätsmaxima mit einer Genauigkeit von ± 1/2 Schritt bestimmen.

Diese Messung wurde 12 mal durchgeführt, wobei die Lichtschranke jedesmal neu angefahren wurde. Tabelle 4.2 gibt die mittleren Schrittzahlen der Lagen der Linien und die Standardabweichungen an. Außerdem sind die Mittelwerte der Schrittdifferenzen zur Linie Hg(253,7), sowie deren Standardabweichungen dargestellt.

λ[nm]	Schritt-zahl	St.abw.	Differenz zu Hg(254)	St.abw. d. Differenz
253,7	413	1,68	-	-
313;2[a]	740	1,68	327	0,90
365,5[b]	1025	2,64	612	1,59
404,7	1241	3,77	828	2,71
435,8	1410	2,59	997	1,96
546,1	2012	1,27	1599	1,51

Tabelle 4.2: Lagen der Hg-Linien und Differenzen zu Hg(253,7) a: Dublett b: Triplett (nicht aufgelöst)

Aus Tabelle 4.2 ist ersichtlich, daß die für die einzelnen Hg-Linien ermittelten Lagen unterschiedlich stark streuen. Neben den durch die begrenzte Anfahrgenauigkeit der Lichtschranke hervorgerufenen Schwankungen, die sich

auf die Lage aller Maxima innerhalb eines Spektrums gleich auswirken, sind auch Streuungen der Abstände der einzelnen Linien zur Linie Hg(253,7) festzustellen. Diese internen Schwankungen besagen, daß der einem Schritt zugeordnete Drehwinkel nicht immer exakt gleich ist. Möglicherweise ist auch die Ungenauigkeit des Anfahrens der Lichtschranke auf einen solchen Effekt zurückzuführen, da die Größenordnungen etwa übereinstimmen. Die höchste vorkommende Gesamtstreuung einer Linie beträgt 3,8 Schritte, was 0,7 nm entspricht.
Aus den Beziehungen zwischen Schrittzahl s und der Wellenlänge für die Lage der einzelnen Quecksilberlinien läßt sich die Kalibrierfunktion aufstellen.

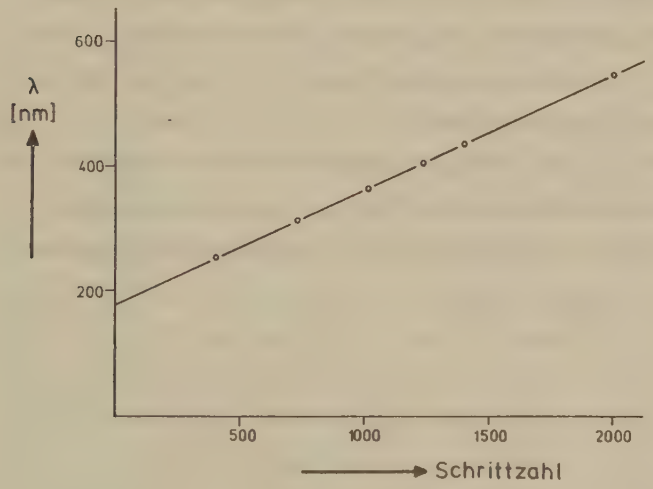


Abb. 4.5: Kalibrierfunktion für den Emissionsmonochromator

Aus einer linearen Regression ergeben sich folgende Werte:

$$\lambda = 0{,}183 \cdot s + 178{,}2 \qquad (4.1)$$

Aus dieser Geradengleichung geht hervor, daß 5,46 Schritte einem Nanometer entsprechen.
Auch die Kalibrierung des Anregungsmonochromators läßt sich prinzipiell mit der Quecksilberlampe durchführen. Da die Kalibrierfunktion des Emissionsmonochromators jedoch schon ermittelt worden war, konnte die für Fluoreszenzmessungen gebräuchliche Versuchsanordnung benutzt werden. Das im Anregungsmonochromator zerlegte Licht der Xenon-Lampe wurde dabei in einer mit einer Aufschlämmung von $BaSO_4$ in Wasser gefüllten Küvette gestreut, wodurch ein Teil nach Durchlaufen des auf dieselbe Wellenlänge eingestellten Emissionsmonochromators auf den Empfänger fiel.
Ein für mehrere Anregungswellenlängen durchgeführter Vergleich der Schrittzahlen für die Lage des Streupeaks ergab die Kalibrierfunktion des Anregungsmonochromators:

$$\lambda = 0{,}183 \cdot s + 177{,}3 \qquad (4.2)$$

4.3.2. Bestimmung der spektralen Spaltbreite

Die Genauigkeit der im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Kalibrierungen ist abhängig von der Sicherheit, mit der die genaue Lage der Intensitätsmaxima bestimmt werden kann. Diese ist umso größer, je schmaler die Peaks sind. Da die Peakbreiten Funktionen der Monochromatorspalte sind, wurden von den vom Hersteller für das Spektrometer angegebenen Spaltkombinationen zur Kalibrierung die mit der geringsten spektralen Spaltbreite gewählt.

Während kleine Spalte eine gute spektrale Auflösung bewirken, wird der Energiedurchlaß natürlich geringer, denn es besteht Proportionalität zwischen der Intensität und dem Quadrat der spektralen Spaltbreite. Daher sind schwache Fluorophore oder geringe Konzentrationen oft nur bei Einsatz breiter Spalte zu vermessen.
Für einige der vom Hersteller angegebenen Spaltkombinationen wurde die effektive spektrale Spaltbreite des Emissionsmonochromators ermittelt. Das geschah durch Registrierung des Profils einer Quecksilberlinie. Dessen Form wird bei gleicher Größe von Eintritts- und Austrittsspalt näherungsweise von einer Dreiecksfunktion bestimmt, deren Halbwertsbreite der spektralen Spaltbreite entspricht. Zur Messung eignet sich die Linie bei 546,1 nm, da es sich hier um eine ungestörte Linie handelt, während die meisten anderen Peaks Überlagerungen mehrerer Linien aufweisen.

In Tabelle 4.3 sind für die in dieser Arbeit benutzten Blendenkombinationen die spektralen Spaltbreiten $\Delta\lambda$ angegeben. Die Numerierung der Spaltversionen richtet sich dabei nach der des Aminco-Instrument Manuals +).

Spaltversion	$\Delta\lambda$[nm]
1	3,5
2	6,5
5	21,6

Tabelle 4.3: Spektrale Spaltbreiten einiger Spaltkombinationen

Zur Registrierung von Fluoreszenzspektren wurde die Spaltversion 2 verwendet, weil hier noch eine relativ gute Auflösung bei nahezu vierfacher Steigerung der Intensität gegenüber Spaltversion 1 erreicht wird. Die Spaltversion 5 ist zur Beobachtung der Gesamtintensität chemilumineszierender Vorgänge geeignet, wo auf höhere spektrale Auflösung verzichtet werden kann.
Eine analoge Messung für den Anregungsmonochromator wurde nicht durchgeführt. Da Anregungs- und Emissionsmonochromator optisch identisch sind, wurden auch gleiche Spaltfunktionen für die einzelnen Spaltversionen angenommen.

+) Instruction No. 768E, S.15

4.3.3. Bestimmung des Rauschens

Für das einem Fluoreszenzsignal überlagerte Rauschen können drei Ursachen verantwortlich sein:

a) das Verstärkerrauschen
b) das Rauschen des Empfängers
c) das Rauschen der Lichtquelle

a) Ein Rauschen des Differenzverstärkers ließ sich im Rahmen der Auflösung des zur Messung benutzten Digitalvoltmeters von 1 mV nicht beobachten.

b) Das Rauschen des Empfängers setzt sich aus einem Dunkelstromanteil und einem vom auftreffenden Strahlungsfluß abhängigen Anteil zusammen. Beide Komponenten lassen sich getrennt bestimmen.
Wenn kein Licht auf den Empfänger fällt, ist bei hoher Verstärkung ein verrauschtes Signal zu beobachten. Da kein Verstärkerrauschen festgestellt werden konnte, ist es auf den Dunkelstrom des SEV zurückzuführen. Sein Betrag läßt sich mit Hilfe eines Potentiometers kompensieren, jedoch addiert sich sein Rauschen zu dem der Meßwerte. Dieses Rauschen, s_{Bl}, wurde aus 100 Einzelmessungen der bei geschlossener SEV-Blende am Digitalvoltmeter anliegenden Spannung zu 1 mV bestimmt.
Die statistischen Schwankungen des Empfängersignals unter Lichteinfluß werden Schrot- oder Schottkyrauschen (shot

noise) genannt (64). Die Größe des Rauschens soll dabei der Quadratwurzel der Intensität proportional sein. Diese Abhängigkeit wurde für die höchste Verstärkerstufe überprüft. Ein Glasstandard wurde mit Licht der Wellenlänge 430 nm angeregt. Durch Einstellung verschiedener Wellenlängen auf der ansteigenden Flanke des Emissionsspektrums zwischen 490 und 510 nm ergaben sich unterschiedlich hohe Strahlungsflüsse, deren Rauschen aus je 40 Intensitätsmessungen am Digitalvoltmeter bestimmt wurde.

Tabelle 4.4 zeigt die gemittelten Intensitäten, ihre Quadratwurzeln und die dazugehörigen Standardabweichungen s_I.

I [mV]	$\sqrt{I}$ [mV]$^{1/2}$	s_I [mV]
103,5	10,2	3,27
208,5	14,4	3,33
293,6	17,1	4,33
404,6	20,1	4,57
496,1	22,3	6,10
608,0	24,7	7,23
719,6	26,8	7,33
794,9	28,2	7,16
916,0	30,3	8,31
1032,0	32,1	8,40

Tabelle 4.4: Standardabweichungen des Rauschens bei verschiedenen Intensitäten

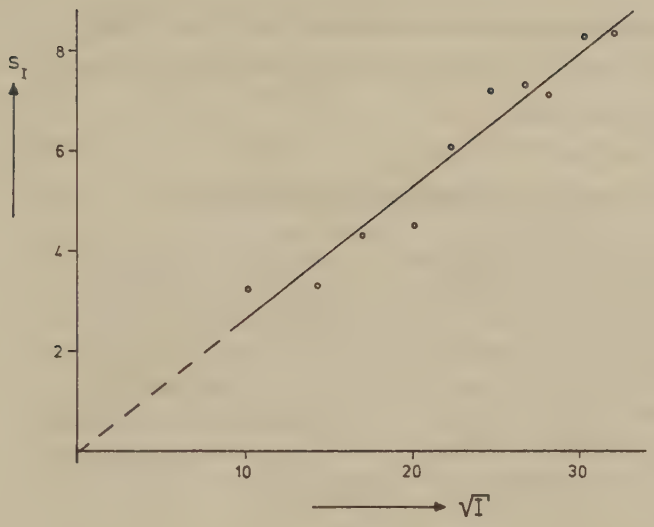


Abb. 4.6: Abhängigkeit des SEV-Rauschens von der Intensität

Abbildung 4.6 zeigt die daraus resultierende Gerade:

$$s_I = 0{,}27 \cdot \sqrt{I} - 0{,}055 \qquad r = 0{,}971 \qquad (4.3)$$

Für kleine Intensitäten ist keine lineare Abhängigkeit mehr gegeben, da das Rauschen des Dunkelstroms dann nicht mehr zu vernachlässigen ist. In der Praxis ergibt sich, wie schon gezeigt wurde, ein Ordinatenabschnitt von 1 mV.

c) Das Rauschen der Xe-Lampe ließ sich nicht separat messen, da ihm immer das Rauschen des Empfängers überlagert ist. Die gefundene lineare Abhängigkeit zwischen dem Gesamtrauschen und der Wurzel der Intensität läßt jedoch

auf reines Schrotrauschen schließen, so daß der durch Fluktuation der Lichtquelle eingebrachte Anteil vernachlässigt werden kann.

Beziehung zwischen Rauschen und Nachweisgrenze

Analog zu der von Kaiser und Specker (65) definierten Nachweisgrenze läßt sich eine minimale Intensität finden, die sich noch gesichert vom Geräterauschen abhebt. Da sich das Rauschen der Lichtquelle und das des Verstärkers vernachlässigen lassen, wird das Gesamtrauschen bei kleiner Intensität durch s_{Bl} bestimmt. Für die Intensität an der Nachweisgrenze $\underline{I}$ ergibt sich also:

$$\underline{I} = 3 \cdot \sqrt{2} \cdot s_{Bl} = 4{,}3 \cdot s_{Bl} \qquad (4.4)$$

Eine zu analysierende Substanz muß also ein Fluoreszenzsignal von mehr als 4,3 mV über dem Dunkelstrom erzeugen.

5. Quantitative Untersuchungen von Fluoreszenzspektren

Wie oben schon erwähnt wurde, kann die Konzentrations-Intensitäts-Beziehung für höhere Extinktionen nicht mehr durch eine lineare Beziehung angenähert werden, da sich die Einflüsse von innerem Filtereffekt und Reabsorption nicht mehr vernachlässigen lassen. Auch die Additivität der Intensitäten in Mischungen ist nicht mehr gegeben. Ist jedoch die Abhängigkeit der Intensität von allen beteiligten Konzentrationen bekannt, so läßt sich aus dieser Funktion der Gehalt jeder Komponente, sowohl in Reinstoffen als auch in Mischungen, bestimmen.
In diesem Abschnitt soll die Messung und Auswertung von Fluoreszenzspektren des Anthracens dargestellt werden. Die daraus resultierenden Erkenntnisse sollen der Untersuchung eines sich zeitlich ändernden Systems dienen, dessen Beschreibung anschließend folgt.

5.1. Berechnung von Fluoreszenzstrahlungsflüssen

Bei der Untersuchung eines Einkomponentensystems ergeben sich für jede Kombination von Anregungs- und Emissionswellenlänge unterschiedliche Konzentrations- Intensitäts-Kurven. Sie unterscheiden sich nicht nur in der Steigung, die ein Maß für die Empfindlichkeit darstellt,

sondern auch in der Grenzkonzentration, bis zu der eine Eichkurve noch als linear angesehen werden kann. Durch die Wahl geeigneter Parameter ist es möglich, alle Eichkurven durch den gleichen mathematischen Ausdruck zu beschreiben. Wie in Abschnitt 2.1.1 schon dargelegt wurde, sind verschiedene derartige Ansätze bekannt, welche die bei Anregung und Emission auftretenden physikalischen Vorgänge unterschiedlich genau berücksichtigen.
Im folgenden wird die Entwicklung eines derartigen Ansatzes beschrieben. Dabei ist die Geometrie der Meßküvette von Bedeutung, deren Grundriß in Abbildung 5.1 schematisch dargestellt ist.

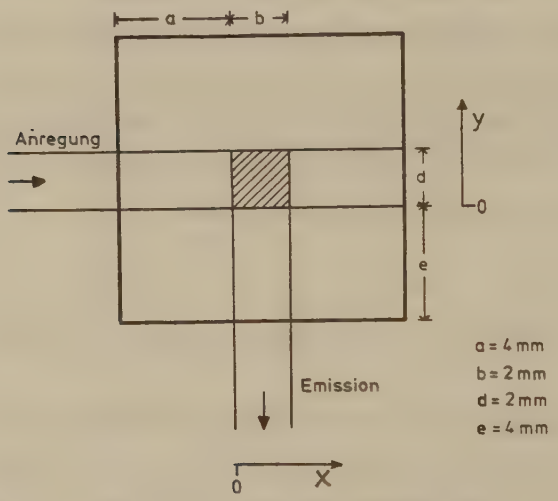


Abb. 5.1: Grundriß der Meßküvette

Der Anregungsmonochromator leuchtet nur einen Ausschnitt der Breite d aus. Ebenso "sieht" der Empfänger nur einen Ausschnitt der Breite b. Die absoluten Größen b und d hängen ebenso wie die Größen a und e, der für den inneren Filtereffekt bzw. die Reabsorption verantwortlichen Schichten, von den Abmessungen der eingesetzten Spalte ab. Die in Abbildung 5.1 angegebenen Werte gelten für die Spaltversion 2, die bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen vorzugsweise benutzt wurde.
Da die Spalte eine Begrenzung der Lichtbündel auf die Höhe h (Höhenkoordinate: z) bewirken, berechnet sich das für den zu messenden Strahlungsfluß F "effektive Fluoreszenzvolumen" zu

$$V = b \cdot d \cdot h \qquad (5.1)$$

Diese einen Quader beschreibende Gleichung stellt allerdings einen Idealfall dar, weil auf Grund der Abbildung weder paralleles Licht eingestrahlt, noch parallel austretendes Fluoreszenzlicht beobachtet wird. Auf diese Abweichungen vom Idealfall soll hier aber nicht eingegangen werden.
Wird ein Volumenelement innerhalb des Quaders betrachtet, so beträgt die Zahl der ausgestrahlten Fluoreszenzquanten dN_F einer bestimmten Wellenlänge:

$$dN_F = q \cdot dN_A \qquad (5.2)$$

Hier beschreibt dN_A die Zahl der im Volumenelement von

Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregten Quanten, während q die wellenlängenabhängige, spektrale Quantenausbeute darstellt. Die Zahl der angeregten Quanten ist proportional dem absorbierten Strahlungsfluß des in x-Richtung einfallenden Anregungslichts, welches sich für kleine Extinktionen durch das Produkt aus Strahlungsfluß und Extinktion ausdrücken läßt, sowie dem Querschnitt dy·dz.

$$dN_A = k_1 \cdot \epsilon_a \cdot c \cdot I_A \cdot dx \cdot dy \cdot dz \qquad (5.3)$$

Hier ist ϵ_a der Extinktionskoeffizient bei der Anregungswellenlänge, c die Konzentration des Fluorophors und k_1 eine Proportionalitätskonstante.
Der Strahlungsfluß der Erregerstrahlung an der Stelle x im effektiven Fluoreszenzvolumen, I_A, beträgt:

$$I_A = I_o \cdot \exp\left[-m \cdot \epsilon_a \cdot c \cdot (a+x)\right] \qquad (5.4)$$

wobei (a+x) die Dicke der bereits durchstrahlten Schicht darstellt, während I_o der Strahlungsfluß des auf die Küvette fallenden Anregungslichts ist. (m = ln 10 = 2,303)

Der vom Volumenelement dV in alle Raumrichtungen ausgehende Fluoreszenzstrahlungsfluß dF' ist proportional der Anzahl der Fluoreszenzquanten mit k_2 als der Proportionalitätskonstanten.

$$dF' = k_1 \cdot k_2 \cdot q \cdot \epsilon_a \cdot c \cdot I_o \cdot \exp\left[-m \cdot \epsilon_a \cdot c \cdot (a+x)\right] \cdot dx \cdot dy \cdot dz \qquad (5.5)$$

Auf den Detektor trifft allerdings nur der Anteil des in y-Richtung ausgestrahlten Lichts, was sich durch die Geometriekonstante k_3 berücksichtigen läßt. Da dieses Licht bis zu seinem Austritt aus der Küvette die Schicht (y+e) durchläuft, wird es auch hier durch Absorption geschwächt, so daß sich für den zu messenden Strahlungsfluß dF ergibt:

$$dF = k_3 \cdot dF' \cdot \exp[-m \cdot \epsilon_f \cdot c \cdot (e+y)] \qquad (5.6)$$

wobei ϵ_f den Extinktionskoeffizienten bei der Beobachtungswellenlänge darstellt.
Nach Zusammenfassen der Konstanten lautet der den meßbaren Fluoreszenzstrahlungsfluß im Volumenelement beschreibende Ausdruck:

$$dF = k_4 \cdot q \cdot \epsilon_a \cdot c \cdot I_o \cdot \exp[-m \cdot \epsilon_a \cdot c \cdot (a+x)] \cdot \exp[-m \cdot \epsilon_f \cdot c \cdot (e+y)] \, dx \cdot dy \cdot dz \qquad (5.7)$$

Der vom Volumen V in y-Richtung ausgestrahlte Fluoreszenzstrahlungsfluß bei der betrachteten Wellenlänge, dF_I, ergibt sich aus dem Integral von Gleichung 5.7 über die drei Raumrichtungen,

$$dF_I = \int_0^h \int_0^d \int_0^b dF \cdot dx \cdot dy \cdot dh \qquad (5.8)$$

oder:

$$dF_I = k_4 \cdot q \cdot \epsilon_a \cdot c \cdot I_o \cdot \exp(-m \cdot \epsilon_a \cdot c \cdot a) \cdot \exp(-m \cdot \epsilon_f \cdot c \cdot e) \cdot \int_0^h \int_0^d \int_0^b \exp(-m \cdot \epsilon_a \cdot c \cdot x) \cdot \exp(-m \cdot \epsilon_f \cdot c \cdot y) \cdot dx \cdot dy \cdot dz \qquad (5.9)$$

Auf Grund der Voraussetzung einer gleichmäßigen Ausleuchtung des effektiven Fluoreszenzvolumens kann eine Abhängigkeit des differentiellen Fluoreszenzstrahlungsflusses von der Höhenkoordinate ausgeschlossen werden: die Integration von dF über z liefert also den Faktor h, welcher der Spalthöhe entspricht, und der sich in die Konstante einbeziehen läßt. Mit den Abkürzungen:

$$A = \epsilon_a \cdot c \cdot m \tag{5.10}$$

$$R = \epsilon_f \cdot c \cdot m \tag{5.11}$$

ergibt sich aus Gleichung 5.9 nach Separation der voneinander unabhängigen Variablen:

$$dF_I = K \cdot q \cdot I_o \cdot \frac{A}{m} \cdot \exp(-A \cdot a) \cdot \exp(-R \cdot e) \cdot \int_0^b \exp(-A \cdot x)\, dx \cdot \int_0^d \exp(-R \cdot y)\, dy \tag{5.12}$$

Damit folgt die Lösung des Integrals über das Volumen zu:

$$dF_I = K \cdot q \cdot I_o \cdot \frac{1}{R \cdot m} \cdot \exp(-A \cdot a) \cdot \exp(-R \cdot e) \cdot [1-\exp(-A \cdot b)] \cdot [1-\exp(-R \cdot d)] \tag{5.13}$$

Mit Hilfe dieser Gleichung lassen sich bei gegebener Konzentration des Fluorophors Fluoreszenzstrahlungsflüsse berechnen. Umgekehrt kann aus einem gemessenen Strahlungsfluß die Konzentration ermittelt werden, wobei allerdings ein iteratives Verfahren angewendet werden muß, da sich die Gleichung nicht nach c auflösen läßt (30). Auf Grund des hohen Zeitbedarfs eines solchen Verfahrens wäre es daher wünschenswert, eine einfachere Beziehung zwischen

Strahlungsfluß und Konzentration zu entwickeln als Gleichung 5.13, die sich bestenfalls zu einem Produkt dreier Exponentialfunktionen zusammenfassen läßt.

Ein kürzerer Ausdruck ergibt sich bei Ersatz der Integrale über x und y in Gleichung 5.12 durch zwei identische Näherungen. Das Prinzip der Näherung soll an Hand des x-abhängigen Terms der Gleichung 5.7 vorgestellt werden. Dieser Term beschreibt die Abhängigkeit des Strahlungsflusses des Anregungslichtes, welcher der erzeugten Fluoreszenzstrahlung proportional ist, vom Ort der Küvette. Er hat nach Durchlaufen der nur absorbierenden Schicht a den konstanten Wert I^a_{eff}:

$$I^a_{eff} = I_o \cdot \exp(-A \cdot a) \qquad (5.14)$$

während er nach Austritt aus dem vom Detektor beobachteten Teil der Küvette den Wert I^{a+b}_{eff} aufweist.

$$I^{a+b}_{eff} = I^a_{eff} \cdot \exp(-A \cdot b) \qquad (5.15)$$

Sein in Abbildung 5.2 dargestellter Verlauf läßt sich mit:

$$I_A = I^a_{eff} \cdot \exp(-A \cdot x) \qquad (5.16)$$

beschreiben.

Die Integration dieser Funktion führt zu der Lösung des x-abhängigen Terms von Gleichung 5.12, welche den entsprechenden Teil der Gleichung 5.13 bildet:

$$I_I = \int_0^b I_A \cdot dx = -\frac{1}{A} \cdot [1-\exp(-A \cdot b)] \cdot I^a_{eff} \qquad (5.17)$$

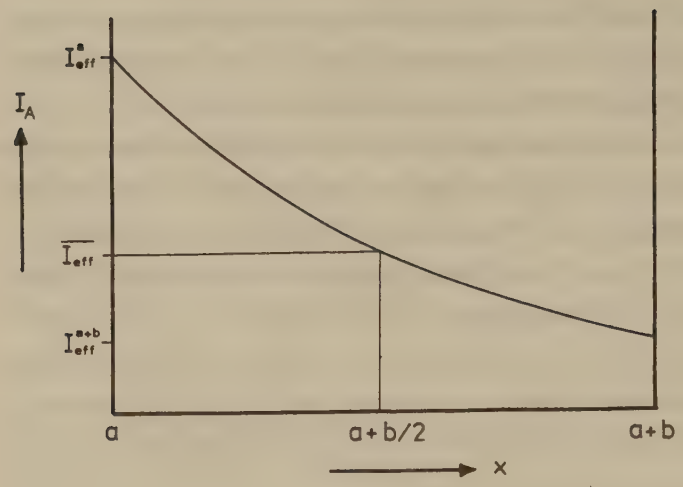


Abb. 5.2: Intensitätsverlauf der Erregerstrahlung im beobachteten Teil der Küvette

Ist die Extinktion des Fluorophors in der Schicht b jedoch klein, so läßt sich ein linearer Verlauf der Abnahme des Strahlungsflusses annehmen. Es läßt sich dann ein mittlerer Strahlungsfluß des Anregungslichtes im beobachteten Küvettenraum berechnen.

$$\overline{I_{eff}} = I^{a}_{eff} \cdot \exp(-A \cdot b/2) \qquad (5.18)$$

Dessen Integration über x liefert:

$$\overline{I} = \int_{0}^{b} \overline{I_{eff}} \cdot dx = \overline{I_{eff}} \cdot b \qquad (5.19)$$

Das Integral unter der in Abbildung 5.2 dargestellten Kurve ist also durch ein Rechteck ersetzt worden.

Der durch die Vereinfachung hervorgerufene Fehler

$$\Delta = \frac{I_I - \bar{I}}{\bar{I}} \qquad (5.20)$$

ist abhängig von der Extinktion. Tabelle 5.1 gibt die mit beiden Modellen berechneten, integralen Strahlungsflüsse des Anregungslichtes in Einheiten von I^a_{eff} für verschiedene Extinktionen bei der Schichtdicke b von 0,2 cm an.

Aus der Tabelle geht hervor, daß der Fehler bis zu einer Extinktion von etwa 0,3, das entspricht E=1,5 in der 1cm-Küvette, vernachlässigt werden kann, da er unter 2%

$E_{0,2}$	$E_{1,0}$	I_I/I^a_{eff}	$\bar{I}/I^a_{eff}$	Δ(%)
0,0	0,0	0,2000	0,2000	0,0
0,1	0,5	0,1786	0,1783	0,2
0,2	1,0	0,1603	0,1589	0,9
0,3	1,5	0,1444	0,1416	2,0
0,4	2,0	0,1307	0,1262	3,6
0,5	2,5	0,1188	0,1125	5,6
0,6	3,0	0,1084	0,1002	8,2
0,7	3,5	0,0993	0,0893	11,2
0,8	4,0	0,0914	0,0796	14,8
0,9	4,5	0,0844	0,0710	18,9
1,0	5,0	0,0782	0,0632	23,7

Tabelle 5.1: Nach zwei Modellen berechnete Strahlungsflüsse des Anregungslichtes

liegt. Bei konzentrierteren Lösungen können die Korrekturfaktoren in die Formel zur Intensitätsberechnung einbezogen werden.

Für den y-abhängigen Term von Gleichung 5.12 läßt sich eine analoge Vereinfachung durchführen. Er berücksichtigt die Reabsorption des im Volumenelement ausgestrahlten Fluoreszenzlichtes. Die Integration des differentiellen Fluoreszenzstrahlungsflusses über y läßt sich auch hier durch das Produkt aus einem mittleren Strahlungsfluß und der halben Schichtdicke d/2 ersetzen. Damit ergibt sich als angenäherte Lösung der Gleichung 5.12 für den gesamten Fluoreszenzstrahlungsfluß $\overline{dF}$:

$$\overline{dF} = K \cdot q \cdot \epsilon_a \cdot c \cdot I_o \cdot b \cdot d \cdot \exp[-A \cdot (a+b/2)] \cdot \exp[-R \cdot (d/2+e)] \qquad (5.21)$$

Die gegenüber Gleichung 5.13 erreichte Vereinfachung zeigt sich darin, daß Gleichung 5.21 nur einen Exponentialausdruck enthält, da sich beide Exponentialterme noch zusammenfassen lassen, worauf in der Darstellung aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet wird.
Das Produkt aus K, q, ϵ_a, I_o, b und d ist eine konzentrationsunabhängige Konstante. Da sie stoffspezifisch ist und auch abhängig von Anregungs- und Emissionswellenlänge, soll sie als Emissionskoeffizient Q bezeichnet werden. Für $\overline{dF}$ ergibt sich also:

$$\overline{dF} = Q \cdot c \cdot \exp[-A \cdot (a+b/2)] \cdot \exp[-R \cdot (d/2+e)] \qquad (5.22)$$

Die Bestimmung der Emissionskoeffizienten kann mit Hilfe sehr verdünnter Lösungen durchgeführt werden, bei denen die Absorption von Anregungs- und Fluoreszenzstrahlung auf den Strecken a und e zu vernachlässigen ist. Gleichung 5.13 reduziert sich dann zu:

$$dF_v = K \cdot q \cdot I_o \cdot \frac{1}{R \cdot m} \cdot [1-\exp(-A \cdot b)] \cdot [1-\exp(-R \cdot d)] \qquad (5.23)$$

Der Index v berücksichtigt, daß es sich um verdünnte Lösungen handelt. Beide Exponentialterme lassen sich als Taylor-Reihe entwickeln. Weil $A \cdot b$ und $R \cdot d$ sehr klein sind, wird davon nur der lineare Teil berücksichtigt, so daß sich für den Strahlungsfluß dF_v einer verdünnten Lösung mit der Konzentration c_v ergibt:

$$dF_v = K \cdot q \cdot I_o \cdot \epsilon_a \cdot b \cdot d \cdot c_v \qquad (5.24)$$

Für Q gilt also:

$$Q = \frac{dF_v}{c_v} \qquad (5.25)$$

Der Emissionskoeffizient ist geräteabhängig. Sämtliche Geräteparameter, als deren wichtigste die Intensitätsverteilung der Lampe, die Geometrie der Monochromatoren, sowie die Empfindlichkeitsverteilung des Empfängers zu nennen sind, lassen sich jedoch als konstant während der Aufnahme der Konzentrationsreihe ansehen. Da in die Berechnung der Spektren konzentrierter Lösungen die aus der Registrierung verdünnter Lösungen erhaltenen Emissionskoeffizienten eingehen, kürzen sich diese Einflüsse heraus.

5.2. Messung und Verarbeitung der Fluoreszenzspektren von Anthracen

Kalibrierung der Verstärkerempfindlichkeit

Die Kalibrierung der Verstärkerempfindlichkeit und damit auch die Möglichkeit reproduzierbarer Messungen wurde durch einen Glasstandard ermöglicht. Bei der Spaltversion 2 ergab sich die maximale Fluoreszenzintensität bei den Wellenlängen:

Anregung: 425,4 nm
Emission: 534,1 nm

Bei der Verstärkung f=10 wurde diesem Fluoreszenzstrahlungsfluß am Verstärker und am Digitalvoltmeter mit Hilfe des Empfindlichkeitspotentiometers die Intensität 1000 zugeordnet. Da sowohl Anregungs- wie auch Emissionspeak sehr breit sind, ist ein Einfluß der Anfahrgenauigkeit von Lichtschranken und Meßwellenlängen auf die Eichung vernachlässigbar, wie sich auch das Rauschen bei dem niedrigen Verstärkungsfaktor nicht negativ bemerkbar macht.

Festlegung der Meßparameter

Als feste Wellenlängen für die Aufnahme der Anregungs- und Emissionsspektren des Anthracens wurden gewählt:

Anregung: 249,2 nm
Emission: 398,3 nm

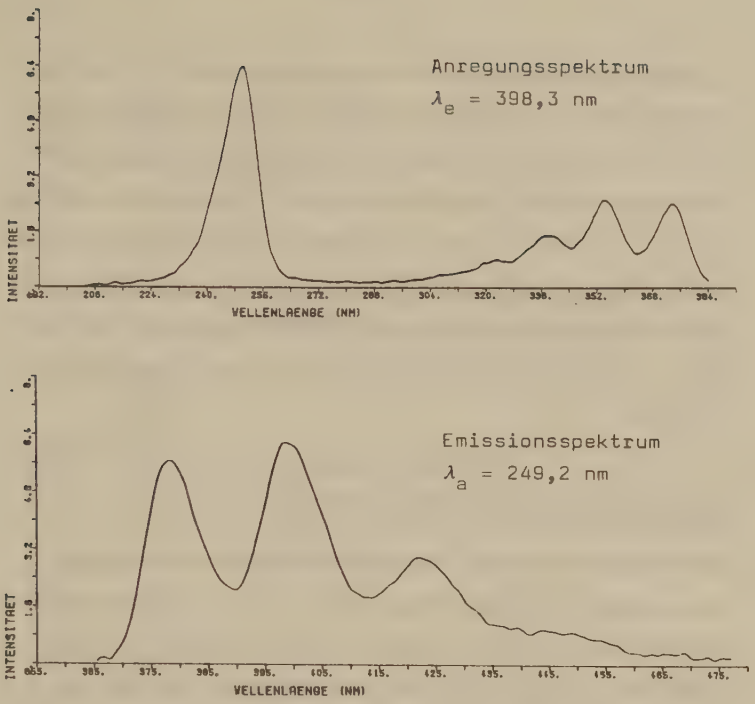


Abb. 5.3: Anregungs- und Emissionsspektrum des Anthracens

Wie Abbildung 5.3 zeigt, befinden sich hier die Maxima der entsprechenden Spektren.

Bei den angegebenen Bedingungen wurden die Anregungs- und Emissionsspektren von 9 Lösungen verschiedener Anthracenkonzentrationen in i-Octan gemessen. Die kleinste Konzentration war 10^{-8} mol/l, die größte betrug 10^{-4} mol/l. Die Aufnahmen ließen sich mit Hilfe des schon beschriebenen Meßprogramms durchführen. Dabei wurde jeder Wert 10 mal akkumuliert. Der Meßpunktabstand betrug 0,55 nm. Die Anregungsspektren wurden von 177,3 bis 460 nm, die Emissionsspektren von 178,2 bis 600 nm ge-

messen. Von den Meßpunkten enthalten natürlich die hinter der festen Emissionswellenlänge (Anregungsspektrum), bzw. vor der Anregungswellenlänge (Emissionsspektrum) liegenden keine Information. Durch die Registrierung der Spektren in diesen Grenzen ergaben sich aber Vereinfachungen bei der Datenerfassung und -behandlung.
Für jedes Spektrum wurde der Verstärkungsfaktor so gewählt, daß das Maximum der Intensität möglichst nahe bei 1000 lag.

Festlegung der Registriergeschwindigkeit

Im Hinblick auf die später durchzuführenden Messungen während einer Reaktion soll auch hier eine möglichst hohe Aufnahmegeschwindigkeit erreicht werden, die aber noch keine Verzerrung der Spektren bewirkt. Die maximal mögliche Geschwindigkeit hängt von der Zeitkonstanten des Empfängersystems und von der Integrationszeit des Digitalvoltmeters ab. Die Zeitkonstante wird vom Hersteller nicht angegeben. Der zeitliche Verlauf des Intensitätsanstiegs bei Registrierung eines rechteckigen Lichtimpulses ergibt jedoch, daß sie kleiner als die Integrationszeit des A/D-Wandlers ist, so daß diese allein geschwindigkeitsbestimmend ist.
Da das Digitalvoltmeter mit einer Rate von 12,5/s wandelt, benötigt die Aufnahme eines Meßwertes bei 10maliger Akkumulation 0,8 s. Unter Vernachlässigung der vom Mikro-

prozessor für die Verarbeitung benötigten Zeit, sowie der Laufzeit für je 3 Schritte, ist bei den gegebenen Bedingungen eine minimale Aufnahmedauer von 410 s pro Anregungsspektrum (512 Meßpunkte) und 615 s pro Emissionsspektrum (768 Meßpunkte) möglich. Diese Zeiten lassen sich natürlich durch die Registrierung eines kleineren Wellenlängenintervalls oder die Wahl eines grösseren Meßpunktabstandes verringern.

Registrierung der Lösungsmittelspektren

Unter den gleichen Bedingungen wie die Anthracenmessungen mußten auch die Aufnahmen der Lösungsmittelfluoreszenz erfolgen, welche bei der Auswertung zu subtrahieren ist. Die Lumineszenz des i-Octan beträgt im Durchschnitt etwa 3 Einheiten bei der höchsten Verstärkung. Bei ca. 357 nm des Anregungsspektrums ist die Stokes-Linie des Raman-Effekts bei der Beobachtungswellenlänge zu bemerken. Sie rührt von den CH-Valenzschwingungen des i-Octans bei etwa 2900 cm^{-1} her. Das Emissionsspektrum weist im Intervall der Lumineszenzverteilung des Anthracens zwischen 340 und 480 nm keine nennenswerten Peaks auf. Die Raman-Bande ist hier bei 269 nm zu erwarten, sie liegt also in einem Bereich, der zur Auswertung nicht herangezogen wurde.

Verarbeitung der Spektren

Alle Spektren wurden zunächst auf Magnetbandkassette gespeichert und auf Lochstreifen ausgegeben. Dadurch war die Übergabe der Daten in den Großrechner möglich [+]. Zur Reduktion der Meßpunktzahl wurden dort die im Abstand von 0,55 nm vorliegenden Intensitätswerte durch lineare Interpolation auf ganzzahligen Wellenlängen zugehörige Größen umgerechnet. Die Interpolation bewirkt gleichzeitig eine Glättung über je 2 Punkte.
Nach dem Ausstanzen der im Nanometerabstand vorliegenden Intensitätswerte auf Lochkarten standen die Spektren von i-Octan und der verschiedenen Anthracenkonzentrationen für weiteres Verarbeiten im Abschnittsmodus zur Verfügung.

Ermittlung und Verarbeitung der Extinktionskoeffizienten

Die zur Spektrenberechnung notwendigen Extinktionskoeffizienten des Anthracens wurden im Bereich von 200-400 nm auf einem UV-VIS Spektralphotometer [++] im Abstand ganzer Nanometer gemessen und ebenfalls auf Lochkarten übertragen. Da das Absorptionsspektrometer aber eine wesentlich kleinere spektrale Spaltbreite aufweist als das Fluorimeter, mußte hier eine Korrektur durchgeführt werden. Die Monochromasie des Erregerlichts wird nämlich durch die spektrale Spaltbreite des Anregungsmonochromators be-

+) Computer Gesellschaft Konstanz mbH, Konstanz, Typ TR 440
++) Carl Zeiss, Oberkochen, Typ PMQ II

stimmt, was auch die Größe der Extinktion beeinflußt. Für die am PMQ II mit sehr kleiner Spalttreite gemessenen Extinktionen gilt nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz:

$$E = \lg \frac{\Phi_o}{\Phi} = \epsilon \cdot c \cdot d \qquad (5.26)$$

Φ_o und Φ stellen den Strahlungsfluß vor- bzw. nach Durchlaufen des absorbierenden Mediums (Schichtdicke d) bei der Wellenlänge λ_o dar.
Wegen der großen spektralen Spaltbreite des Aminco-Gerätes kann das Anregungslicht nicht als monochromatisch angesehen werden. Die in Gleichung 5.13 bzw. 5.21 einzusetzende Extinktion berechnet sich dann zu:

$$E_F = \lg \frac{I_o}{I} = \epsilon_F \cdot c \cdot d \qquad (5.27)$$

I_o und I sind die mit der Spaltfunktion $Z(\lambda_o, \lambda)$ gefalteten Strahlungsflüsse. E_F und ϵ_F sind die daraus resultierenden Extinktion bzw. Extinktionskoeffizient. I_o und I berechnen sich aus den wellenlängenabhängigen, ungefalteten Strahlungsflüssen φ_o und φ nach:

$$I_o = k \cdot \int \varphi_o(\lambda) \cdot Z(\lambda_o, \lambda)\, d\lambda \qquad (5.28)$$

$$I = k \cdot \int \varphi_o(\lambda) \cdot 10^{-E(\lambda)} \cdot Z(\lambda_o, \lambda)\, d\lambda \qquad (5.29)$$

Unter der Voraussetzung, daß kein Streulicht vorhanden ist, läßt sich $Z(\lambda_o,\lambda)$ durch die in Abschnitt 4.3.2 schon beschriebene Dreiecksfunktion darstellen. ist b deren Halbwertsbreite, so ergeben sich die Integrationsgrenzen als λ_o-b und λ_o+b.
Die genaue Berechnung von E_F ist schwierig, deshalb soll hier nur eine Abschätzung vorgenommen werden. Dazu werden folgende Vereinfachungen durchgeführt:

1. Im Bereich der spektralen Spaltbreite von 6,5 nm (Spaltversion 2) soll die Unabhängigkeit von φ_o von der Wellenlänge angenommen werden. Daraus folgt:

$$I_o = k \cdot \varphi_o \cdot \int Z(\lambda_o,\lambda)\, d\lambda \qquad (5.30)$$

$$I = k \cdot \varphi_o \cdot \int 10^{-E(\lambda)} \cdot Z(\lambda_o,\lambda)\, d\lambda \qquad (5.31)$$

2. Da die bei Fluoreszenzmessungen auftretenden Extinktionen im allgemeinen sehr klein sind, läßt sich ansetzen:

$$10^{-E} = (1 - m \cdot E) \qquad (5.32a)$$

$$10^{-E_F} = (1 - m \cdot E_F) \qquad (5.32b)$$

Für die gefaltete Extinktion E_F folgt daraus:

$$10^{-E_F} = (1-mE_F) = \frac{I}{I_o} = \frac{\int [1-mE(\lambda)] \cdot Z(\lambda_o,\lambda)\, d\lambda}{\int Z(\lambda_o,\lambda)\, d\lambda} \qquad (5.33)$$

Nach Umformung ergibt sich:

$$\varepsilon_F = \frac{c \cdot d \cdot \int \epsilon(\lambda) \cdot Z(\lambda_0, \lambda)\, d\lambda}{\int Z(\lambda_0, \lambda)\, d\lambda} \qquad (5.34)$$

Zur Berechnung der für die Fluoreszenzanregung effektiven Extinktionen müssen also die am PMQ II bestimmten Extinktionskoeffizienten mit der Spaltfunktion gefaltet werden. Nach Ersetzen des Integrals durch eine Summe läßt sich diese Spaltfunktion durch einen Satz von Koeffizienten g mit einem Abstand $\Delta\lambda$ von 1 nm ausdrücken. Die normierten Werte von g für die Spaltversion 2 sind in Tabelle 5.2 zusammengestellt.

$\Delta\lambda$ [nm]	g
0	1,00
1	0,89
2	0,73
3	0,56
4	0,37
5	0,15
6	0,01

Tabelle 5.2: Normierte Koeffizienten zur Beschreibung der Spaltfunktion für die Spaltversion 2

Nach Faltung der gemessenen Extinktionskoeffizienten mit dieser Spaltfunktion lassen sich die für die Anregung der Fluoreszenz effektiven Extinktionen bestimmen, mit deren Hilfe Fluoreszenzstrahlungsflüsse berechnet werden können, wie in Abschnitt 5.3 gezeigt wird.

Berechnung der Emissionskoeffizienten

Die Berechnung der Emissionskoeffizienten und damit auch der Anregungs- und Emissionsspektren läßt sich mit dem Fortran-Programm INTBER durchführen. Sein Ablaufdiagramm ist im Anhang dargestellt. Über das Unterprogramm SPEK erfolgt die graphische Ausgabe der gemessenen und berechneten Spektren.
Zur Berechnung gemittelter Emissionskoeffizienten für jede Wellenlänge werden nach Gleichung 5.24 vom Programm die vermessenen Lösungen herangezogen, deren Produkt aus ϵ'_a und c bei der entsprechenden Anregungswellenlänge einen Wert kleiner als 0,02 ergibt, wobei ϵ'_a gefaltete Extinktionskoeffizienten darstellt. Diese Lösungen, deren Extinktion bei der vom Auswerteformalismus (Gl. 5.22) berücksichtigten Schichtdicke von 0,5 cm weniger als 0,01 beträgt, lassen sich noch als derartig verdünnt für die entsprechende Anregungswellenlänge ansehen, daß der innere Filtereffekt zu vernachlässigen ist. Die Emissionskoeffizienten der einzelnen Anregungswellenlängen werden also aus unterschiedlich vielen Einzelwerten ge-

mittelt. Je kleiner der entsprechende Extinktionskoeffizient ist, was einer geringeren Fluoreszenzintensität und einem schlechteren Signal-Rausch-Verhältnis entspricht, umso mehr Messungen können zur Mittelung herangezogen werden.
Zur Berechnung der gemittelten Emissionskoeffizienten für die Emissionsseite wurden Spektren der Konzentrationen 10^{-8} mol/l, $5 \cdot 10^{-8}$ mol/l und 10^{-7} mol/l berücksichtigt, denn der Extinktionskoeffizient der Anregung ist für alle Emissionswellenlängen gleich, nämlich 141800 $l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$.

5.3. Vergleich der gemessenen und berechneten Spektren von Anthracen

In den Abbildungen 5.4 und 5.5 sind für einige Konzentrationen die berechneten und gemessenen Anregungs- und Emissionsspektren des Anthracens gegenübergestellt. Durch die Anpassung der Emissionsspektren wurde ein empirischer Faktor von 1,07 ermittelt, mit dem die Schichtdicke zu multiplizieren ist, um die nicht gleichmäßige Ausleuchtung der Küvette durch die Lichtquelle zu kompensieren.

Die Struktur der Anregungsspektren zeigt eine deutliche Abhängigkeit von der Konzentration. Während in Spektren der kleinen Konzentrationen die Bande bei 250 nm dominiert, wird sie im Vergleich mit den anderen Peaks

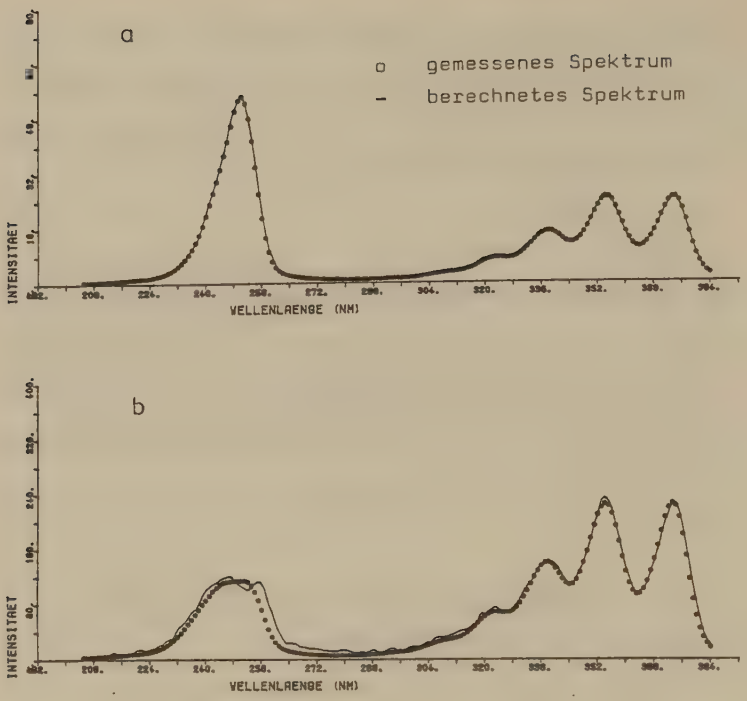


Abb. 5.4: Anregungsspektren von Anthracen a) $c=10^{-6}$ mol/l
λ_e = 398,3 nm b) $c=10^{-5}$ mol/l

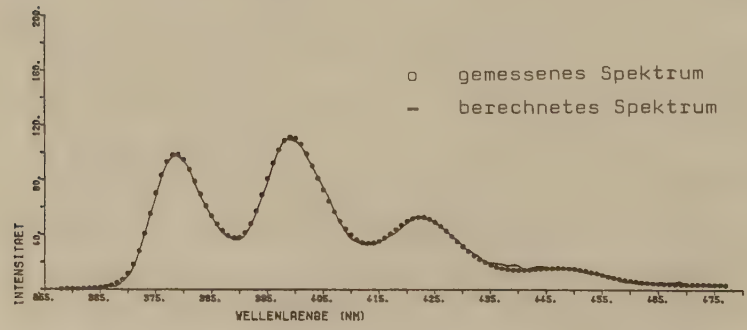


Abb 5.5: Emissionsspektrum von Anthracen $c=10^{-5}$ mol/l
λ_a = 249,2 nm

bei steigender Konzentration immer kleiner, bis die Intensität oberhalb von 10^{-5} mol/l sogar abnimmt. Da diese Bande auch zur Anregung bei der Aufnahme der Emissionsspektren diente, wird deren Intensitätsverlauf bei steigender Konzentration auch stark vom inneren Filtereffekt beeinflußt. Die Reabsorption der Bande bei 379 nm fällt dagegen kaum ins Gewicht, obwohl sich das Verhältnis der beiden stärksten Peaks bei Übergang von verdünnter zu 10^{-5} M Lösung um etwa 4% zugunsten der nicht von Reabsorption betroffenen Bande bei ca. 398 nm verschiebt.

Wie Abb. 5.5 zeigt, ist aber auch bei einer Konzentration von 10^{-5} mol/l noch eine gute Anpassung des berechneten an das gemessene Spektrum möglich, obwohl bei der Schichtdicke von 0,5 cm die Extinktion für das Anregungslicht ca. 0,7 beträgt.

Der Verlauf der gesamten Konzentrations-Intensitäts-Kurve für die Anregungswellenlänge von 250 nm und eine Emission bei 398,3 nm ist als Beispiel für eine solche Auftragung in Abbildung 5.6 dargestellt. Der Extinktionskoeffizient für die Anregungswellenlänge beträgt hier 140000 $l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$.

Oberhalb einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-6}$ mol/l Anthracen sinkt die Fluoreszenzintensität wieder, da die durch den inneren Filtereffekt hervorgerufene Abnahme der Anregungsintensität vor dem effektiven Fluoreszenzvolumen größer ist als die durch die Konzentrationserhöhung bewirkte Zunahme an fluoreszenzfähigen Molekülen.

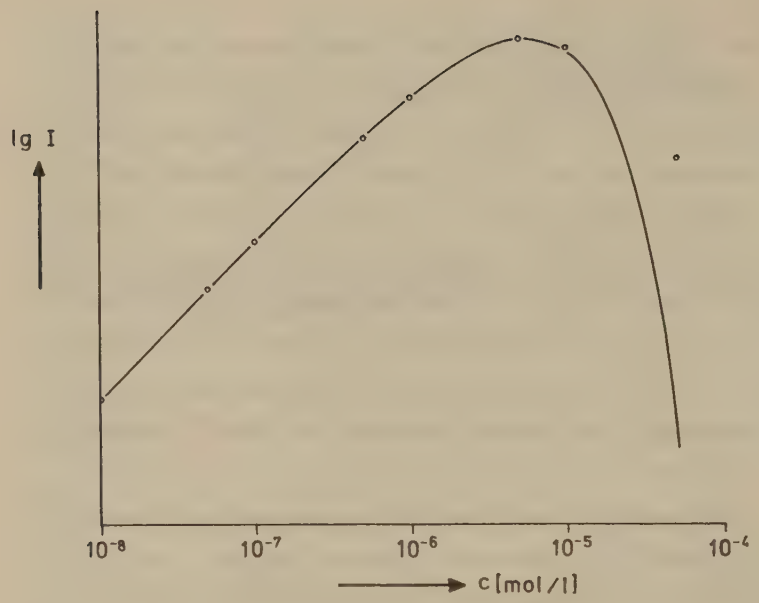


Abb. 5.6: Konzentrations-Intensitäts-Kurve von Anthracen bei λ_a = 250 nm und λ_e = 398,3 nm

Die bei der Anthracenkonzentration von $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l auftretende Diskrepanz zwischen gemessener und berechneter Intensität kann darauf zurückzuführen sein, daß der verwendete Auswerteformalismus von einem quaderförmigen effektiven Fluoreszenzvolumen ausgeht. Zur Berücksichtigung solch hoher Extinktionen müßte jedoch die genaue geometrische Ausleuchtung der Küvette bekannt sein und in die Berechnungsformel eingehen. Die hier vorgenommene Verwendung eines empirisch ermittelten Korrekturfaktors (1,07) ist zwar mit einem geringeren Rechenaufwand ver-

bunden, kann aber den wirklichen Sachverhalt nur ungenau beschreiben.
Die Eichkurve kann jedoch nur für Konzentrationen bis zur maximalen Intensität analytisch ausgenutzt werden, da sie sonst ihre Eindeutigkeit verliert. In diesem Bereich liefert die vereinfachte Formel eine befriedigende Anpassung, so daß die Abweichungen für die höheren Konzentrationen und damit Extinktionen außer Betracht gelassen werden können.
Bei der Benutzung einer solchen Eichkurve zur quantitativen Analyse ist zu beachten, daß mit der Steigung der Kurve auch die Empfindlichkeit in gleichem Maße abnimmt. Dieser Effekt kann die Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses mit steigender Intensität kompensieren. Soll ein größerer Konzentrationsbereich erfaßt werden, ist es möglicherweise sinnvoller, Anregungs- und Emissionswellenlänge so zu wählen, daß die Steigung der Eichkurve für einen möglichst weiten Konzentrationsbereich konstant bleibt, auch wenn damit eine geringere Empfindlichkeit für kleine Konzentrationen verbunden ist.

Quantitativer Vergleich von gemessenen und berechneten Strahlungsflüssen

Eine quantitative Untersuchung der Genauigkeit der Intensitätsberechnung soll an Hand eines Vergleichs zwischen gemessenen und berechneten Spektren durchgeführt werden.

Hierzu wurden sowohl aus den Anregungs- wie aus den Emissionsspektren alle die Wellenlängen herangezogen, deren Intensitäten sich bei der kleinsten Konzentration und der höchsten Verstärkung (f=1000) um 100 Einheiten von den Blindwerten unterscheiden. Da es sich um 10 mal akkumulierte Werte handelt, bedeutet das eine Mindestintensität von 10 Einheiten für den Einzelwert.
Nach Abschnitt 4.3.3 beträgt das Rauschen 1 Einheit, wodurch sich ein Signal-Rausch-Verhältnis $(S/N)_1$ von 10 ergibt. Für die akkumulierten Werte folgt:

$$(S/N)_{10} = (S/N)_1 \cdot \sqrt{10} \qquad (5.26)$$

Das Rauschen beträgt also etwa 3% für den kleinsten Meßwert. Für größere Intensitäten verbessert es sich entsprechend ihrer Quadratwurzel.
Für die Anregungsspektren liegt der auswertbare Bereich nach obiger Bedingung zwischen 236 und 257 nm sowie zwischen 330 und 379 nm. Sie werden also durch je 72 Punkte im Abstand 1 nm dargestellt. In Tabelle 5.3 sind für einige Konzentrationen die gemittelten Intensitäten $\overline{I_{gem}}$ und $\overline{I_{ber}}$ für die gemessenen und berechneten Anregungsspektren in relativen Einheiten (E.) aufgeführt.
Für die Emissionsspektren liegt der auswertbare Bereich zwischen 372 und 444 nm. Tabelle 5.4 gibt hier die mittleren Intensitäten wieder.
Ein Vergleich beider Tabellen zeigt, daß sich für kleine Konzentrationen größere Intensitätswerte für die Emis-

c [mol/l]	$\overline{I_{gem}}$ [E.]	$\overline{I_{ber}}$ [E.]	Δ [%]
10^{-8}	0,228	0,235	-3,0
$5 \cdot 10^{-8}$	1,19	1,17	1,7
10^{-7}	2,46	2,34	4,9
$5 \cdot 10^{-7}$	11,05	11,35	-2,7
10^{-6}	21,70	21,91	-1,0
$5 \cdot 10^{-6}$	83,61	86,23	-3,1
10^{-5}	134,42	139,89	-4,1

Tabelle 5.3: Gemittelte Intensitäten der gemessenen und berechneten Anregungsspektren

c [mol/l]	$\overline{I_{gem}}$ [E.]	$\overline{I_{ber}}$ [E.]	Δ [%]
10^{-8}	0,309	0,309	0,0
$5 \cdot 10^{-8}$	1,56	1,54	1,3
10^{-7}	3,06	3,04	0,7
$5 \cdot 10^{-7}$	14,86	14,19	4,5
10^{-6}	25,73	25,98	-1,0
$5 \cdot 10^{-6}$	61,87	64,32	-4,0
10^{-5}	53,76	53,42	0,6

Tabelle 5.4: Gemittelte Intensitäten der gemessenen und berechneten Emissionsspektren

sionsspektren als für die entsprechenden Anregungsspektren ergeben. Die Auswertung der Emissionsspektren führt also zu einer höheren Empfindlichkeit, die auf dem hohen Extinktionskoeffizienten bei der Anregungswellenlänge

von 249,3 nm basiert. Zur Analyse höherer Konzentrationen ist unter den hier beschriebenen Meßbedingungen die Benutzung der Anregungsspektren sinnvoller, weil sich da der innere Filtereffekt nicht so stark bemerkbar macht.

Die relativen Abweichungen zwischen gemessenen und berechneten Spektren bleiben unter 5%. Für diese Abweichungen sind 4 Effekte verantwortlich. Neben statistischen Schwankungen bei der Datenaufnahme können Verdünnungsfehler auftreten, die sich sowohl bei den gemessenen wie bei den berechneten Spektren bemerkbar machen. Denn die Berechnung der Spektren höherer Konzentrationen basiert ja auf den Emissionskoeffizienten, die aus der Messung verdünnter Lösungen erhalten wurden.
Eine dritte Fehlerquelle ist die Ungenauigkeit beim Anfahren der festen Beobachtungswellenlänge. Diese war in Abschnitt 4 mit $\pm$ 1/2 nm festgelegt worden. Im Gegensatz dazu sind die Banden, bei deren Maxima die Beobachtungswellenlängen liegen, relativ breit, so daß die durch die Anfahrungenauigkeit hervorgerufenen Fehler bei der Intensitätsmessung $\pm$ 1% nicht übersteigen.
Wie aus Abbildung 5.4 b) ersichtlich ist, geht in die Abweichung der Spektren höherer Konzentrationen natürlich auch die mit dem vereinfachten Modell nicht mehr befriedigend mögliche Anpassung der Bande bei 249,3 nm ein, was als 4. Fehlermöglichkeit zu nennen wäre.

5.4. Verringerung des inneren Filtereffekts durch Veränderung des Probenraums

Zur Erweiterung des linearen Teils der Eichkurve zu höheren Konzentrationen ist eine Verringerung der Extinktion einer Probelösung vor allem in den nur absorbierenden Teilen (Breiten a und e in Abb. 5.1) der Küvette nötig. Durch einen Umbau des Probenraumes wurde die Küvette aus ihrer zentralen Lage verschoben, so daß das beobachtete Fluoreszenzvolumen näher an ihren Rand zu liegen kam. Auf diese Weise ergab sich eine Verkleinerung der nur absorbierenden Schichten. Abbildung 5.7 zeigt eine schematische Aufsicht der umgebauten Küvettenhalterung.

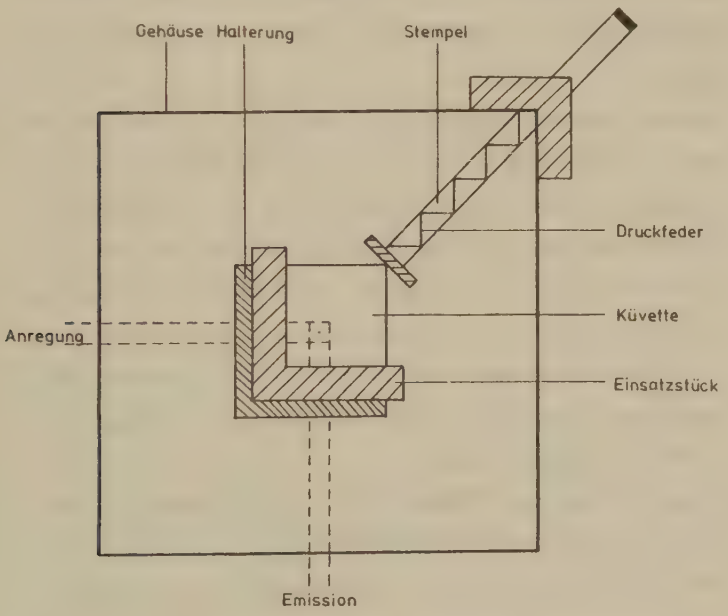


Abb. 5.7: Aufsichtsskizze des umgebauten Probenraumes

Im ursprünglichen Probenraum, der über das Gehäuse mit den beiden Monochromatoren verschraubt ist, schloß die eigentliche Halterung die 1-cm Küvette an den 4 Längsseiten so ein, daß sie genau im Zentrum des Raumes plaziert war. In den in Richtung auf die Monochromatoren zeigenden Seiten befanden sich Vorrichtungen zum Einführen von Spalten, welche zur Begrenzung der Lichtbündel notwendig sind. Die beiden anderen Wände hatten nur die Aufgabe, die Lage der Küvette zu stabilisieren. Beide wurden entfernt. Ihre Funktion übernimmt ein Stempel, der durch das Gehäuse und einen daran angeschlossenen Keil geführt wird. Über eine Druckfeder ist der Stempel so mit dem Gehäuse verbunden, daß die Federkraft die Küvette gegen die verbleibenden Wände der Halterung drückt.

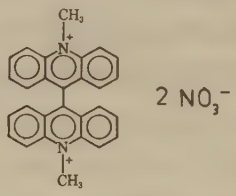
Zwischen die beiden Wände der Halterung und die Küvette können keilförmige Einsatzstücke gesetzt werden, die eine Verschiebung der Küvette in Richtung auf den Stempel bewirken. Wie aus Abbildung 5.7 ersichtlich ist, ergibt sich daraus, daß der effektive Fluoreszenzraum, der seine Lage relativ zu Anregungs- und Emissionsstrahl nicht verändert hat, nicht mehr im Zentrum der Küvette liegt, was zu der gewünschten Verkleinerung der nur absorbierenden Schichten führt.

Es wurden 3 Einsatzstücke gefertigt, aus denen Dicken der nur absorbierenden Schichten a und e von 3, 2 oder 1 mm resultieren. Es läßt sich dadurch eine Verschie-

bung der Maxima der Konzentrations-Intensitäts-Kurve auf die 4-fache Konzentration erreichen. Gleichzeitig vergrößert sich der zu vermessende Konzentrationsbereich um denselben Faktor. Außerdem wird durch die größere Steigung der Eichkurve eine Erhöhung der Empfindlichkeit für Konzentrationen nahe am Maximum erreicht. Diese Effekte sind gerade im Hinblick auf die Vermessung sich zeitlich ändernder Systeme wünschenswert, da hier größere Konzentrationsintervalle vorkommen können.

6. Untersuchung der Reaktion von Lucigenin mit H_2O_2 in alkalischer Lösung

Die bei der Oxidation von Bis-N-methylacridinium-nitrat, Lucigenin (I), auftretende Chemilumineszenz wurde zuerst von Gleu und Petsch (66) beschrieben.



I

Die Reaktion findet mit verschiedenen Oxidationsmitteln sowohl in wäßriger wie in organischer Lösung statt und zeichnet sich durch eine relativ hohe Quantenausbeute von 0,01 bis 0,02 aus (67).

6.1. Theorien des Reaktionsmechanismus

Obwohl bisher eine Reihe von Arbeiten erschienen ist, die sich mit der Oxidation des Lucigenins unter verschiedenen Bedingungen befaßt, konnte der Reaktionsmechanismus noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Als Endprodukte wurden jedoch Methylacridon (II) und bei höheren Lucigeninausgangskonzentrationen auch Dimethylbiacriden (III) identifiziert.

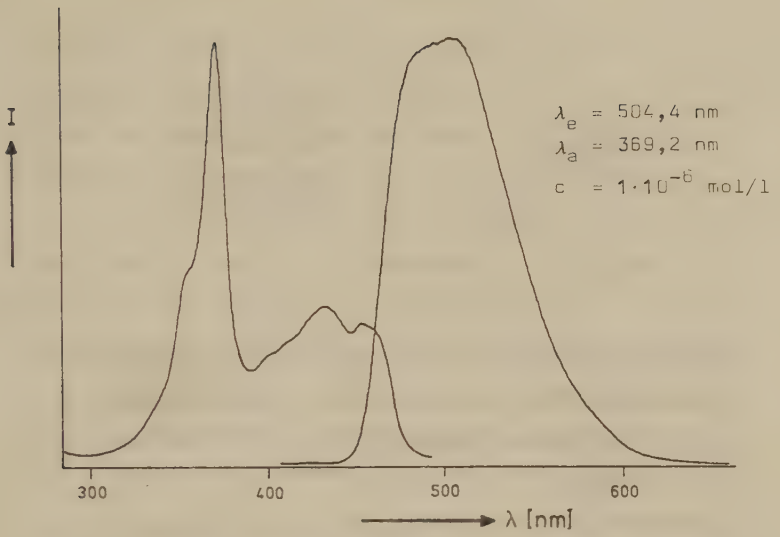


Abb. 6.1: Anregungs- und Emissionsspektrum von Lucigenin

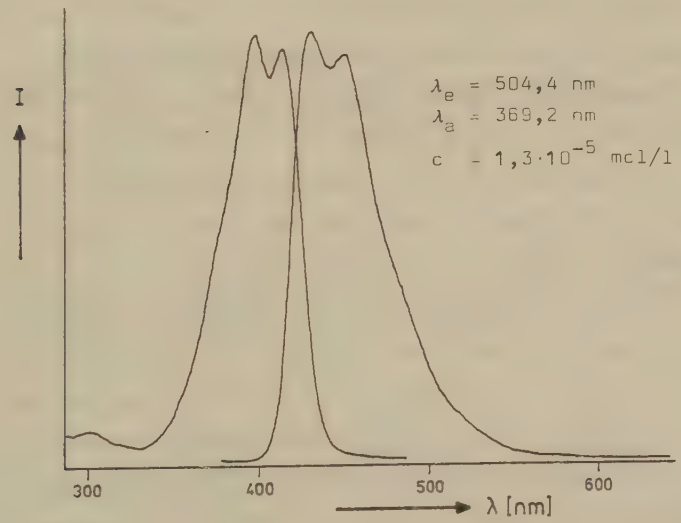
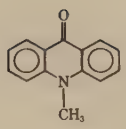
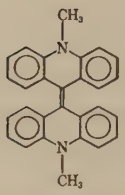


Abb. 6.2: Anregungs- und Emissionsspektrum von Methylacridon



II



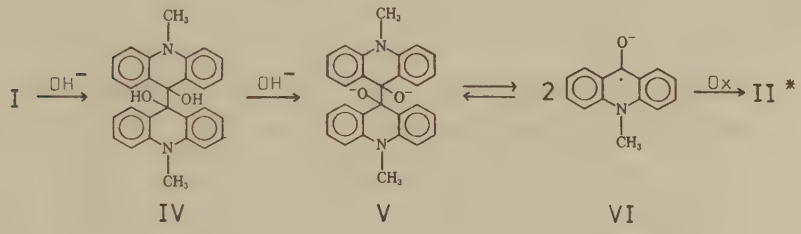
III

Die Abbildungen 6.1 und 6.2 zeigen die Anregungs- und Emissionsspektren von Lucigenin und Methylacridon. Die Absorptionsspektren beider Substanzen sind in Abbildung 6.4 dargestellt.

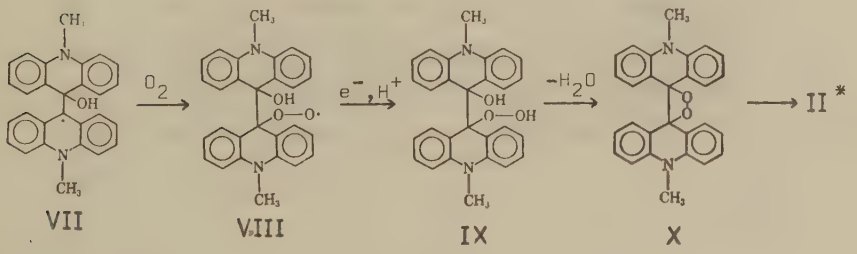
Über die Natur der chemilumineszierenden Verbindung besteht noch Unklarheit. In organischen Lösungsmitteln wird Methylacridon im angeregten Zustand gebildet, wie Vergleiche zwischen seinem Emissionsspektrum und dem Chemilumineszenzspektrum beweisen (67,68). Beide Spektren sind identisch, jedoch findet bei Überschuß an Lucigenin ein Energietransfer von der chemilumineszierenden Komponente auf Lucigenin statt, der das Chemilumineszenzspektrum zu höheren Wellenlängen verschiebt.

Das Maximum der Chemilumineszenz in wäßrigen Lösungen mit O_2 oder H_2O_2 als Oxidationsmitteln wird zwischen 465 und 485 nm angegeben (67,69,70). Möglicherweise handelt es sich also bei der chemilumineszierenden Spezies nicht um Methylacridon. Totter postuliert die Entstehung eines kurzlebigen Zwischenproduktes im angeregten Zustand (67,71), während McCapra zwar Methylacridon als

angeregtes Produkt ansieht, aber Energietransfer zu Lucigenin oder Zwischenprodukten annimmt (49). Die Diskrepanz bei der Angabe des Maximums deutet darauf hin, daß je nach Reaktionsbedingungen unterschiedliche Konzentrationsverhältnisse an möglichen Energieakzeptoren auftreten, wobei es sich um unverbrauchtes Lucigenin wie auch um Zwischenprodukte handeln kann.
Es werden sowohl ionische wie auch radikalische Reaktionsmechanismen diskutiert. Janzen und Mitarbeiter (72) beschreiben, ausgehend von ESR-Messungen, verschiedene Reaktionswege, die auch nebeneinander ablaufen können. Der wahrscheinlichste Weg wird folgendermaßen angegeben:



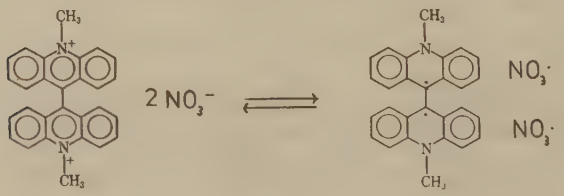
Auf Grund des Nachweises von VII durch ESR wird folgende Nebenreaktion angenommen (Bildung von VII: s.S. 97):



Über die Anlagerung des $HO_2\cdot$ -Radikals an VII bei Einsatz von H_2O_2 statt molekularem Sauerstoff ergibt sich ein ähnlicher Reaktionsmechanismus, obwohl es nicht gelang, Lucigeninradikale bei Verwendung von H_2O_2 als Oxidationsmittel nachzuweisen.

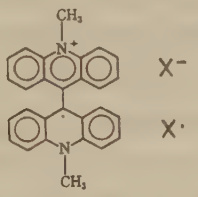
Das Auftreten des Dioxetans X wird auch von anderen Autoren als gesichert angesehen, da der Zerfall eines solchen Derivats in 2 angeregte Methylacridonmoleküle nach dem in Abschnitt 3.1 diskutierten Mechanismus die zur Entstehung von Chemilumineszenz notwendige Energie aufbringen kann. Über die Entstehung des Dioxetans bestehen aber unterschiedliche Ansichten. McCapra (49) vermutet bei Verwendung von H_2O_2 eine Anlagerung von OH^- und HO_2^--Ionen an Lucigenin, welches ein Dikation darstellt, was zur Bildung von IX ohne radikalische Zwischenstufe führt.

Wie schon Janzen postulieren auch Maeda und Mitarbeiter (73) einen Radikalmechanismus. Sie sehen Lucigenin als einen Charge-Transfer-Komplex zwischen dem Dikation und den Nitratanionen an. In wäßrigen Lösungen und bei Einsatz eines schwachen Nucleophils wie Nitrat ist der Komplex allerdings stark zur ionischen Seite verschoben.



I Ia

Die Anwendung weniger polarer Lösungsmittel, oder die Behandlung des Lucigenins mit stärkeren Nucleophilen wie t-BuO$^-$, CN$^-$, S^{2-} oder OH$^-$ führt zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zu Ia, wobei das Radikalkation XI als Zwischenstufe auftritt.



XI

Dieses Radikalkation zeigt eine große Ähnlichkeit mit dem bei Anwendung alkalischer Lösung von Janzen entdeckten Radikal VII, welches durch Anlagerung von OH$^-$ an XI entstanden sein kann.
Durch Reaktion des Diradikals mit molekularem Sauerstoff entsteht nach Maeda das Dioxetan X, welches dann unter Aussendung von Chemilumineszenz in Methylacridon zerfällt.

Die Bildung von Dimethylbiacriden III als Endprodukt wird darauf zurückgeführt, daß bei Lucigeninüberschuß gegenüber dem Oxidationsmittel die Konzentration an Radikalen steigt, ihre Weiterreaktion zum Dioxetan jedoch auf Grund der fehlenden Sauerstoffmoleküle langsam ist, so daß sich die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung der Doppelbildung erhöht, obwohl es sich hierbei um einen sehr langsamen Prozeß handelt, der ansonsten nicht ins Gewicht fällt.

6.2. Die Fluoreszenz des Reaktionssystems

Die Untersuchung der Oxidation des Lucigenins erfolgt zweckmäßig über die fluorimetrische Detektion der zeitlichen Änderung von Ausgangs- und Endkomponenten. Dazu müssen aus den während der Reaktion registrierten Fluoreszenzspektren die jeweiligen Konzentrationen bestimmt werden. Aus deren zeitlicher Änderung ist es dann möglich, kinetische Parameter zu berechnen.
Der folgende Abschnitt befaßt sich mit Messung und Auswertung der die Reaktion beschreibenden Spektren. Dazu muß zunächst ein geeigneter Auswertungsalgorithmus entwickelt werden.

6.2.1. Berechnung der Konzentrationen eines Zweikomponentensystems

Ausgehend von dem in Abschnitt 5.1 hergeleiteten Ausdruck zur Intensitätsberechnung von Reinstoffen läßt sich ein ähnlicher Ansatz auch für die Berechnung der Fluoreszenzspektren von Gemischen aufstellen. Dabei wird von der Additivität sowohl der Extinktionen wie der Emissionen ausgegangen. Der Term zur Beschreibung des inneren Filtereffekts berücksichtigt also die Summe der bei der Anregungswellenlänge durch die einzelnen Komponenten hervorgerufenen Absorptionen. Genauso ergibt sich

die Intensität des emittierten Lichts aus der Addition der Strahlungsflüsse der Einzelkomponenten bei der Emissionswellenlänge. Sie wird durch Reabsorption geschwächt, wobei auch hier wieder die Extinktionen aller Komponenten eingehen.

Für ein Zweikomponentensystem ergibt sich der Ansatz zur Berechnung des Fluoreszenzstrahlungsflusses bei der Emissionswellenlänge λ_f und Anregung bei λ_a nach dem in Abschnitt 5.1 beschriebenen Modell als:

$$dF = (Q_1 \cdot c_1 + Q_2 \cdot c_2) \cdot \exp[-m \cdot (\epsilon_{a1} c_1 + \epsilon_{a2} c_2) \cdot (a+b/2)] \cdot \exp[-m \cdot (\epsilon_{f1} c_1 + \epsilon_{f2} c_2) \cdot (d/2+e)] \quad (6.1)$$

$$= (Q_1 \cdot c_1 + Q_2 \cdot c_2) \cdot \exp\left\{-m \cdot [\epsilon_{a1} \cdot (a+b/2) + \epsilon_{f1} \cdot (d/2+e)] \cdot c_1\right\} \cdot \exp\left\{-m \cdot [\epsilon_{a2} \cdot (a+b/2) + \epsilon_{f2} \cdot (d/2+e)] \cdot c_2\right\}$$

Die Indizes weisen dabei auf die Komponenten hin, während sich die Bezeichnungen der Schichtdicken auf die Abbildung 5.1 beziehen.

Bei Kenntnis der Konzentrationen läßt sich der Fluoreszenzstrahlungsfluß für jede Kombination von λ_a und λ_f berechnen. Die Extinktions- und Emissionskoeffizienten müssen zuvor an den Reinkomponenten bestimmt werden. Unbekannte Konzentrationen c_1 und c_2 lassen sich durch iterative Anpassung der berechneten Strahlungsflüsse an gemessene Werte finden. Da zwei Variablen vorliegen, sind zur Iteration mindestens die Strahlungsflüsse von zwei Wellenlängenkombinationen heranzuziehen. Weil aber eine

Überbestimmung zu einer größeren statistischen Sicherheit der Ergebnisse führt, ist es sinnvoll, die Iteration jeweils für ganze Anregungs- bzw. Emissionsspektren durchzuführen.
Zur Ausführung solcher Berechnungen wurde das Fortran-Programm KONZ erstellt, welches im Anhang beschrieben ist. Es basiert auf einem zur Software-Bibliothek des TR440 gehörigen Simplex-Programm MINNB 2.

6.2.2. Bestimmung der kinetischen Daten einer Reaktion 1. Ordnung

Zur Beschreibung einer chemischen Reaktion durch einen mathematischen Algorithmus muß die Reaktionsordnung bekannt sein und zwar sowohl in bezug auf die Gesamtumsetzung als auch in bezug auf jede der beteiligten Komponenten. Zu ihrer Bestimmung sind verschiedene Methoden bekannt (74).
Hier soll versucht werden, die Oxidation des Lucigenins durch einen einfachen Ausdruck darzustellen. Es wird angenommen, daß sowohl der Zerfall der Ausgangskomponente wie die Entstehung des Methylacridons nach einem Zeitgesetz Quasi-1.-Ordnung ablaufen. Das soll experimentell durch Zugabe der Reaktionspartner im Überschuß ermöglicht werden. Ein Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten untereinander und mit der aus der Abnahme der Chemilumi-

neszenzintensität zu ermittelnden kann Hinweise auf mögliche Zwischenprodukte und Nebenreaktionen geben.
Die zeitliche Abhängigkeit der Konzentration der Ausgangskomponente c_A läßt sich durch Gleichung 6.2 beschreiben.

$$c_A = (c_A^o - c_A^e) \cdot \exp(-k_A \cdot t) + c_A^e \qquad (6.2)$$

Hier ist c_A^o die Konzentration des Ausgangsstoffes zur Zeit t=0. Diese Anfangszeit kann bei einer Reaktion 1. Ordnung willkürlich gewählt werden. Die absolute Anfangskonzentration an A geht nicht in die Gleichung ein. c_A^e gibt die Konzentration an nicht umgesetzter Ausgangskomponente bei Beendigung der Reaktion an. Da bei einer Reaktion Quasi-1.Ordnung eine vollständige Umsetzung der Ausgangskomponente erfolgen muß, sollten sich für c_A^e vernachlässigbar kleine Werte ergeben.
Die Ermittlung von k_A erfolgt im allgemeinen aus der Steigung der Auftragung von $\ln(c_A)$ gegen die Zeit t. Der Nachteil dieses Verfahrens liegt in der zu hohen Gewichtung gerade der kleinen und deshalb am wenigsten genauen Werte, was durch das Logarithmieren bewirkt wird.
Eine Methode, die allen Meßpunkten die gleiche Gewichtung zuordnet, wurde von Stevens (75) entwickelt und auch schon zur Auswertung kinetischer Kurven benutzt (76).
Dabei wird die Zielfunktion 6.3, welche die Summe der Abweichungsquadrate über M Meßpunkte darstellt

$$\Delta = \sum_{i=1}^{M} \left\{(c_A^o - c_A^e) \cdot \exp(-k_A \cdot t_i) + c_A^e - c_{Ai}\right\}^2 \qquad (6.3)$$

unter Benutzung ihrer Ableitungen nach den 3 Parametern k, c_A^o und c_A^e iterativ minimiert, wodurch sich die günstigsten Werte für die 3 Parameter erhalten lassen.
Das gleiche Verfahren läßt sich auch auf die Beschreibung der Zunahme der Konzentration der Endkomponente c_E anwenden. Die Konzentrations-Zeit-Beziehung lautet hier:

$$c_E = (c_E^e - c_E^o) \cdot [1 - \exp(-k_E \cdot t)] + c_E^o \qquad (6.4)$$

wobei c_E^e die nach Beendigung der Reaktion vorhandene Konzentration an Endprodukt darstellt, während c_E^o für die zu einem Zeitpunkt t=0 schon vorliegende Konzentration steht. Beide Parameter, sowie die optimale Geschwindigkeitskonstante k_E, lassen sich auch hier wieder durch die Minimierung der Fehlerquadratsumme finden.
Zur Lösung beider Probleme wurden Fortran-Programme beschrieben. Auf deren Auflistung im Anhang wird jedoch verzichtet, da sie hauptsächlich auf Matrizenoperationen basieren, zu deren Durchführung die zur TR440-Software gehörigen Unterprogramme benutzt wurden.

6.2.3. Berücksichtigung der Kinetik bei der Konzentrationsberechnung

Die Intensitäten eines während der Reaktion aufgenommenen Spektrums basieren alle auf verschiedenen Konzentrationsverhältnissen von Ausgangs- und Endkomponente, da sich die Konzentrationen während der Registrierung ändern.

Hier soll zunächst der Fall betrachtet werden, daß die Intensität nur von der Konzentration c_A der abnehmenden Komponente abhängt. Das Spektrum der Komponente A soll dabei aus einer Bande mit Dreiecksprofil bestehen. Sie wird bei 5 diskreten Wellenlängen $\lambda(1)$ bis $\lambda(5)$ mit konstantem Abstand $d\lambda$ vermessen. Da mit konstanter Geschwindigkeit registriert wird, liegen auch feste Zeitintervalle Δt zwischen den Meßpunkten.

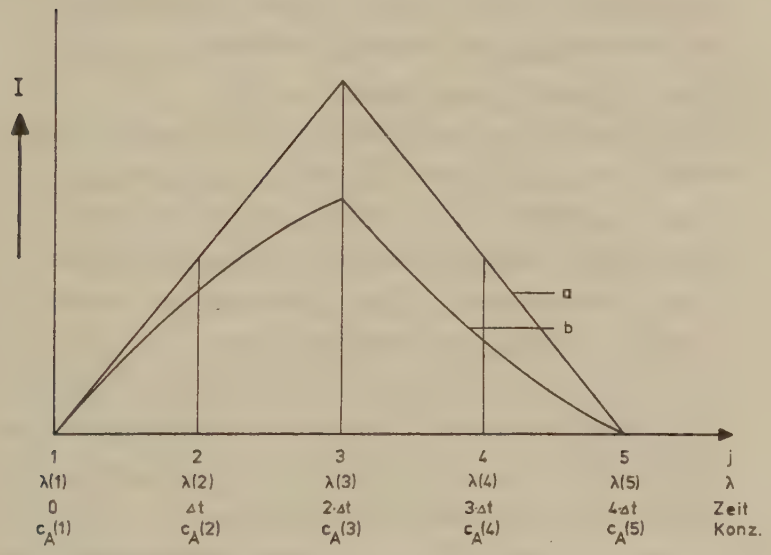


Abb. 6.3: Abhängigkeit des Bandenprofils von der Konzentrationsänderung
a: konstante Konzentration $c_A(1)$
b: exponentielle Abnahme von c_A mit k_A = 0,2/s bei Δt = 1s

Die Kurve a in Abbildung 6.3 zeigt den Fall, daß sich die Konzentration nicht mit der Zeit ändert. Alle Intensitäten basieren auf der Konzentration $c_A(1)$. Im Fall b liegt die Konzentration $c_A(1)$ nur bei Messung an der Stelle $\lambda(1)$ vor. c_A nimmt exponentiell mit der Zeit ab, wobei die Geschwindigkeitskonstante k_A hier 0,2/s bei einem zeitlichen Meßpunktabstand von 1s beträgt. Die Kurve b zeigt, daß die Dreiecksfunktion durch die sich während der Registrierung ändernde Konzentration verzerrt wird. Mit Hilfe eines solchen Spektrums läßt sich keine quantitative Analyse durchführen, da keine feste Konzentration vorliegt.

Bei der Darstellung eines Spektrums durch diskrete Meßpunkte, wie sie bei Benutzung der digitalen Steuerlogik erfolgt, ist es jedoch möglich, jedem der Meßpunkte j=2 bis j=5 seine aktuelle Konzentration zuzuordnen, wenn k_A und Δt bekannt sind. $c_A(j)$ ergibt sich für die nach Gleichung 6.2 abnehmende Komponente zu:

$$c_A(j) = c_A(1) \cdot \exp[-k_A \cdot (j-1)]\,\Delta t \qquad (6.5)$$

$c_A(1)$, die Konzentration zu Beginn der Registrierung, geht hier quasi als Normierungskonstante ein.

Für eine nach Gleichung 6.4 zunehmende Komponente E ergibt sich die Konzentration $c_E(j)$ für die diskreten Meßpunkte j zu:

$$c_E(j) = c_E(1) + [c_E^e - c_E(1)] \cdot \left\{1 - \exp[-k_E \cdot (j-1) \cdot \Delta t]\right\} \qquad (6.6)$$

Hier dient als Normierungsgröße die Differenz von $c_E(1)$ zur maximal möglichen Konzentration c_E^e.
Das Programm KONZ wurde so erweitert, daß jedem gemessenen Strahlungsfluß dF(j), der sich nach Gleichung 6.1 berechnen läßt, seine aktuellen Konzentrationen $c_A(j)$ und $c_E(j)$ zuzuordnen sind. Die für die Anwendung des Simplex-Unterprogramms benötigte Zielfunktion Δ lautet nun:

$$\Delta = \sum_{j=1}^{N} \Big\{ dF(j) - [Q_1 \cdot c_A(j) + Q_2 \cdot c_E(j)] \cdot \exp\Big\{-m \cdot [\epsilon_{aA} \cdot c_A(j) + \epsilon_{aE} \cdot c_E(j)] \cdot (a+b/2)\Big\} \cdot \exp\Big\{-m \cdot [\epsilon_{fA} \cdot c_A(j) + \epsilon_{fE} \cdot c_E(j)] \cdot (d/2+e)\Big\}\Big\}^2 \qquad (6.7)$$

Als Ergebnisse werden $c_A(1)$ und $c_E(1)$ erhalten, so daß sich also eine Korrektur auf die Anfangszeit t=0 ergibt. Da für alle während einer Reaktion aufgenommenen Spektren dieselbe Zeitdifferenz Δt und dieselben Geschwindigkeitskonstanten gelten, kann der Algorithmus auf alle Spektren angewendet werden. Als Endergebnis ergeben sich die von der Zeit abhängigen Werte für $c_A(1)$ und $c_E(1)$ in Intervallen, die der Zeitdifferenz zwischen zwei Spektren entsprechen.
Zu Beginn der Auswertung sind k_A und k_E nicht bekannt. Hier müssen zunächst die Konzentrationen ohne Korrektur bestimmt werden. Aus ihrer zeitlichen Änderung lassen sich dann vorläufige Geschwindigkeitskonstanten erhalten,

mit denen dann wiederum, diesmal mit einer ersten Korrektur, neue Konzentrationen berechnet werden können. Über die Größe der Änderung der Geschwindigkeitskonstanten läßt sich ein Abbruchkriterium für dieses Iterationsverfahren finden.

6.2.4. Ermittlung und Verarbeitung der mit der Fluoreszenzspektroskopie gewonnenen Meßdaten

6.2.4.1. Eichung des Systems

Ausgehend von dem jeweiligen Maximum der in Abbildung 6.1 dargestellten Anregungs- und Emissionsspektren wurden folgende feste Wellenlängen für die Vermessung des Lucigenins gewählt:

Anregungsspektren: λ_e = 504,4 nm

Emissionsspektren λ_a = 369,2 nm

Diese Wellenlängen dienten auch zur Vermessung des Methylacridons, obwohl sich hier Flanken der entsprechenden Fluoreszenzpeaks befinden. Bei der Beobachtung der Umwandlung des Lucigenins in Methylacridon muß jedoch die feste Wellenlänge während der Reaktionsdauer konstant gehalten werden. Da das entstehende Produkt aber stärker als die Ausgangskomponente fluoresziert, wurden die Bedingungen so gewählt, daß der größtmögliche Strahlungsfluß des Lucigenins zu beobachten ist.

Die Messung und Verarbeitung von Lucigeninspektren ver-

schiedener Konzentrationen zwischen 10^{-3} und 10^{-7} mol/l geschah unter den gleichen Bedingungen, wie sie für das Anthracen beschrieben wurden. Allerdings wurde, wie auch bei allen folgenden Messungen, die Dicke der nur absorbierenden Schichten mit Hilfe der entsprechenden Einsatzstücke im Küvettenhalter auf 1 mm reduziert. Als Lösungsmittel diente hier Wasser, dessen Untergrundemission als Blindwert in die Auswertung einging. Aus den Lucigeninspektren ergaben sich die Emissionskoeffizienten nach Gleichung 5.25.

Die Herstellung von Lösungen verschiedener Konzentrationen des Methylacridons geschah durch Umsetzung von Lucigeninlösungen mit H_2O_2 und NaOH. Es wurden jeweils gleiche Volumina NaOH (0,1M), H_2O_2 (0,03M) und Lucigeninlösung verwendet, wobei die Lucigeninkonzentration variiert wurde (10^{-4}M, $5 \cdot 10^{-5}$M und 10^{-5}M).

Zur Kontrolle, ob sich verdünnte und konzentrierte Lucigeninlösungen quantitativ umsetzen, wurde das bei Einsatz von 10^{-5}M Lucigenin erhaltene Reaktionsprodukt mit dem 1:10 verdünnten Produkt verglichen, das bei Verwendung von 10^{-4}M Lucigenin resultiert.

Tabelle 6.1 zeigt für einige Wellenlängen der Anregungs- und Emissionsspektren die Intensitäten I_1 für das 1:10 verdünnte Reaktionsprodukt und I_2 für das mit 10^{-5}M Lucigenin erhaltene Produkt.

Die zwischen entsprechenden Intensitätswerten auftretenden Unterschiede sind sehr gering. Die Reaktion mit kon-

Anregungsspektren			
λ[nm]	I_1 [E.]	I_2 [E.]	Δ[%]
359,2	1283	1249	2,7
391,4	5092	4952	2,7
407,9	5134	5053	1,6
430,0	1054	1042	1,1
Emissionsspektren			
λ[nm]	I_1 [E.]	I_2 [E.]	Δ[%]
422,6	3552	3524	0,8
444,5	4294	4214	1,9
466,4	3020	2961	2,0
488,3	1563	1535	1,8

Tabelle 6.1: Fluoreszenzintensitäten der Reaktionsprodukte von:
I_1: gleiche Volumina von 10^{-4} M Lucigenin, NaOH (0,1M) und H_2O_2 (0,03M)-1:10 verdünnt
I_2: gleiche Volumina von 10^{-5} M Lucigenin, NaOH (0,1M) und H_2O_2 (0,03M)

zentrierter Lucigeninlösung führt also zu demselben Endprodukt wie es bei Verwendung verdünnter Lösung entsteht. Das gilt zumindest dann, wenn Oxidationsmittel und OH^--Ionen im Überschuß vorhanden sind.

Da die Spektren des so erhaltenen Produkts (Abb.6.2) mit

den in der Literatur für Methylacridon angegebenen (67,68) übereinstimmen, kann davon ausgegangen werden, daß sich Lucigenin vollständig umgesetzt hat, wobei als einziges fluoreszierendes Produkt Methylacridon entstanden ist. Unter der Annahme, daß sich keine Nebenprodukte gebildet haben, läßt sich die jeweilige Konzentration an Methylacridon unter Berücksichtigung der Verdünnung aus der eingesetzten Lucigeninkonzentration berechnen. Dabei wird davon ausgegangen, daß sich 1 Molekül Lucigenin zu 2 Molekülen Methylacridon umsetzt.

Wie für Lucigenin lassen sich für Methylacridon bei bekannter Konzentration die Emissionskoeffizienten nach Gleichung 5.25 berechnen.

Die Reproduzierbarkeit der Fluoreszenzspektren des Methylacridons ist u.a. abhängig von der Reproduzierbarkeit der Konzentrationsverhältnisse in der Reaktionsmischung. Zu ihrer Bestimmung wurden die maximalen Intensitäten der Produkte von 10 jeweils neu angesetzten Reaktionslösungen aus H_2O_2, NaOH und 10^{-4}M Lucigenin gemessen. Aus der Streuung ließ sich ein Variationskoeffizient von 2% ermitteln. Mit dieser Streuung ist auch die in der Mischung eingesetzte Lucigeninkonzentration behaftet.

Bestimmung der Extinktionskoeffizienten

Die für die quantitative Analyse nach Gleichung 6.7 benötigten Extinktionskoeffizienten für Lucigenin und Methylacridon wurden im Abstand 1 nm bestimmt. Sie

sind in Abbildung 6.4 dargestellt.

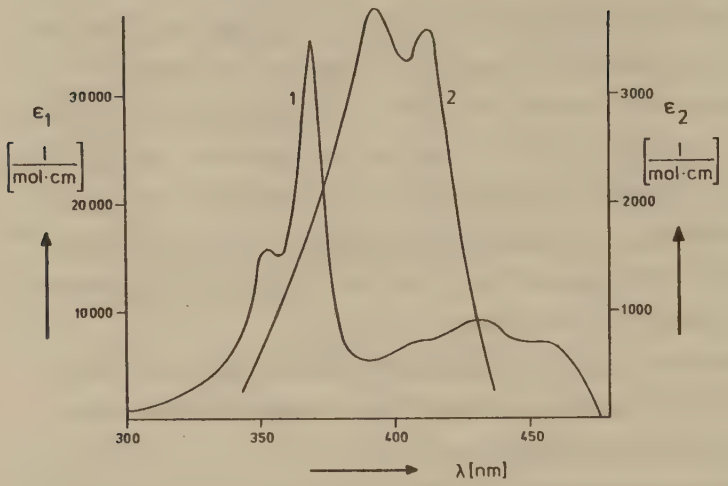


Abb. 6.4: Absorptionsspektren von Lucigenin (1) und Methylacridon (2)

6.2.4.2. Untersuchung des Quenchings der Lucigenin-fluoreszenz durch NaOH

Bei Zugabe von Natronlauge zu einer wäßrigen Lucigeninlösung ist eine starke Abnahme der Fluoreszenzintensität zu bemerken. Wie schon Gleu und Petsch (66) nehmen auch McCapra (49) und Janzen (72) an, daß sich die Carbinolbase IV (s. Abschnitt 6.1) bildet. Diese müßte jedoch ein anderes Absorptionsspektrum als Lucigenin aufweisen,

weil die Anlagerung der OH^--Ionen eine Veränderung des Chromophors zur Folge hat. Da aber keine Änderung der Absorption festzustellen war, kann die Bildung der Carbinolbase in größeren Konzentrationen wohl ausgeschlossen werden. Bei der Verminderung der Fluoreszenz handelt es sich also um einen Löschprozeß.
Die Löschung der Fluoreszenz durch Fremdionen wird durch die Stern-Volmer-Gleichung (77) beschrieben:

$$\frac{I_o}{I} = 1 + k \cdot c_Q \qquad (6.8)$$

Hier ist I_o die Fluoreszenzintensität ohne Zugabe der löschenden Substanz, während I die Intensität bei Anwesenheit des Quenchers mit der Konzentration c_Q angibt. Die Proportionalitätskonstante k kann durch Auftragen von I_o/I gegen c_Q für verschiedene Quencherkonzentrationen

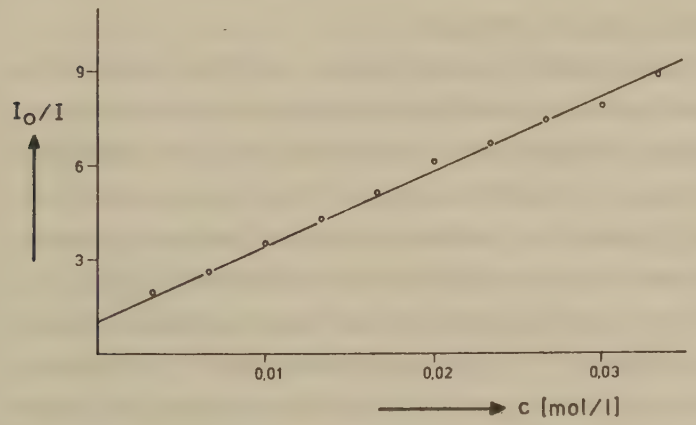


Abb. 6.5: Löschung der Lucigeninfluoreszenz durch NaOH

erhalten werden. Abbildung 6.5 zeigt die Stern-Volmer-Gerade für den Fall der Löschung der Lucigeninfluoreszenz durch NaOH.
Die Größe von k ergibt sich aus der Neigung zu 242 l/mol, was einer Halbwertskonzentration von 4,1 mmol/l entspricht. Die gute Anpassung der experimentellen Werte an die Theorie zeigt, daß die Löschung durch die OH^--Ionen oder durch eine Verbindung hervorgerufen wird, deren Konzentration den OH^--Ionen proportional ist.
Im Gegensatz zu Lucigenin läßt sich bei weiterer Zugabe von Natronlauge zu ausreagierter Methylacridonlösung keine Abnahme der Fluoreszenzintensität feststellen.

6.2.4.3. Der Meßvorgang

Temperierung der Meßzelle

Zur Temperierung des Küvettenraums wurde der Deckel mit einem Ansatzstück versehen, durch welches sich Stickstoffgas auf die Küvette leiten läßt. Das Gas strömt zuvor durch eine Kupferspirale von 10m Länge, die sich in einem Thermostaten befindet. Über die Temperatur des Wassers im Thermostaten und die Strömungsgeschwindigkeit läßt sich das Gas und damit auch der Küvettenraum thermostatisieren. Alle Messungen wurden bei 28°C durchgeführt. Die Schwankungen der Temperatur ließen sich unterhalb ± 0,2°C halten. Zur Messung diente ein Digital-

thermometer mit einem Pt-100-Fühler, welcher über ein kleines Loch im Deckel in den Küvettenraum eingeführt werden kann.

Datenaufnahme und -verarbeitung

Gemessen und ausgewertet wurden die Anregungs- und Emissionsspektren während der Reaktion von je 2 Mischungsansätzen.

Ansatz	c_{Luc} [µmol/l]	$c_{H_2O_2}$ [mol/l]	c_{NaOH} [mol/l]
A	1,67	0,01	0,033
B	16,67	0,01	0,033

Tabelle 6.2: Konzentrationen der untersuchten Reaktionsmischungen

Je 1 ml NaOH, H_2O_2 und Lucigeninlösung wurden in einer Fluoreszenzküvette zusammengegeben und durch Schütteln gemischt. Die Lösungen waren zuvor auf etwa 28°C temperiert worden. Nach Einsetzen der Meßzelle in den Küvettenraum wurden die Fluoreszenzspektren in Abständen von 4 min mit dem schon beschriebenen Datenerfassungsprogramm aufgenommen, wobei sich die Zeitintervalle über den externen Timer einstellen ließen.
Während der Aufnahmezeit eines Spektrums sollten die Konzentrationsänderungen möglichst klein sein. Deshalb

wurde der Abstand zweier Meßpunkte gegenüber der Messung der Reinkomponenten vergrößert, so daß sich bei verringerter Auflösung ein Zeitgewinn erreichen ließ.
Die Anregungsspektren wurden von 310 bis 480 nm mit einem Meßpunktabstand von 1,65 nm registriert. Der Meßbereich wurde durch 105 Punkte dargestellt. Die weniger strukturierten Emissionsspektren wurden durch 97 Meßpunkte beschrieben, die einen Abstand von 2,2 nm aufwiesen. Der Bereich der Registrierung betrug 390 bis 600 nm.
Eine gleiche Einstellung der Registriergeschwindigkeit, wie sie bei der Messung der Anthracenspektren beschrieben wurde, ergab eine Aufnahmezeit von 93 s pro Spektrum. Jeder Meßwert wurde 10 mal akkumuliert. Der zeitliche Abstand zwischen 2 Meßpunkten betrug 0,886 s für die Anregungsspektren und 0,959 s für die Emissionsspektren. Während der Dauer der unkatalysierten Reaktion, die je nach Konzentration der Reagenzien zwischen 1 und 2 Stunden betrug, wurden bis zu 30 Spektren registriert. Sie ließen sich hintereinander im RAM-Bereich des Mikrocomputers abspeichern. Nach Beendigung der Meßserie wurden die Intensitätswerte auf Lochstreifen ausgestanzt. Nach Eingabe der Lochstreifen in den Großrechner ließen sich zur weiteren Auswertung im Abschnittsmodus Lochkarten mit den Intensitätswerten erhalten.
Auf eine Interpolation der Meßwerte auf Intensitäten ganzzahliger Wellenlängen wurde hier verzichtet, da der Meßpunktabstand dazu zu groß war. Deshalb wurden die als

Eingabedaten für das Programm KONZ benötigten Extinktions- und Emissionskoeffizienten der Reinkomponenten durch lineare Interpolation auf die den Intensitätswerten zugehörigen Wellenlängen umgerechnet. Die in wäßriger Lösung erhaltenen Emissionskoeffizienten des Lucigenins wurden außerdem durch einen Korrekturwert dividiert, der nach Gleichung 6.8 das Quenching durch die bei der Messung eingesetzten OH^--Ionen berücksichtigt.

6.2.5. Diskussion der Ergebnisse

Die Abbildungen 6.6 und 6.7 zeigen die Fluoreszenzspektren mit fortschreitender Reaktionszeit für den Ansatz A. Die Spektren a sind die praktisch noch unveränderten Anregungs- und Emissionsspektren des Lucigenins (s. Abb. 6.1); die Konzentrationsänderung während der Scanzeit von 93 s ist klein. Die Spektren p der ausreagierten Lösungen sind die des Methylacridons (s. Abb. 6.2).
Während die Anregungsspektren von Lucigenin und Methylacridon etwa die gleiche maximale Intensität zeigen, unterscheiden sich die Emissionsspektren (Abb. 6.7) in ihrer Höhe etwa um den Faktor 2, obwohl bei der für Lucigenin günstigsten Wellenlänge angeregt wurde.
Beide Darstellungen der Reaktion zeigen isosbestische Punkte. Sie lassen darauf schließen, daß keine fluoreszierenden Zwischenprodukte in meßbaren Konzentrationen

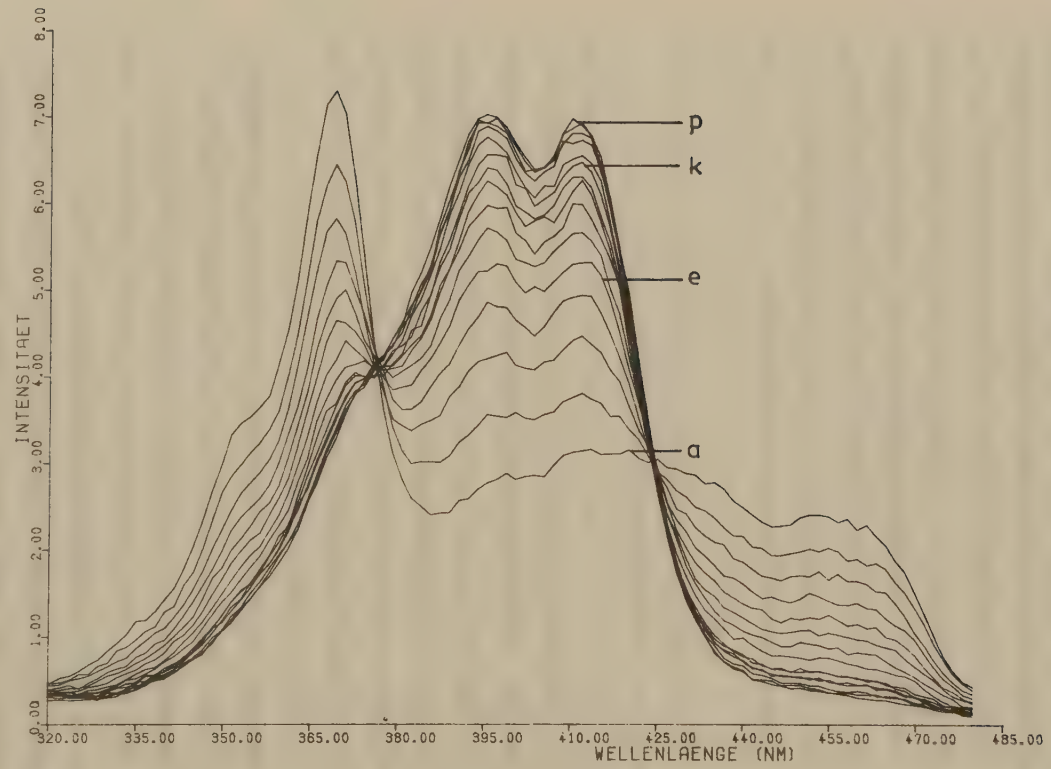


Abb. 6.6: Anregungsspektren während der Oxidation von Lucigenin
Scanzeit 93s; Emissionswellenlänge 504,4 nm; Reaktionsansatz A
Scanbeginn a: 0 min; e: 16 min; k: 36 min; p: 56 min

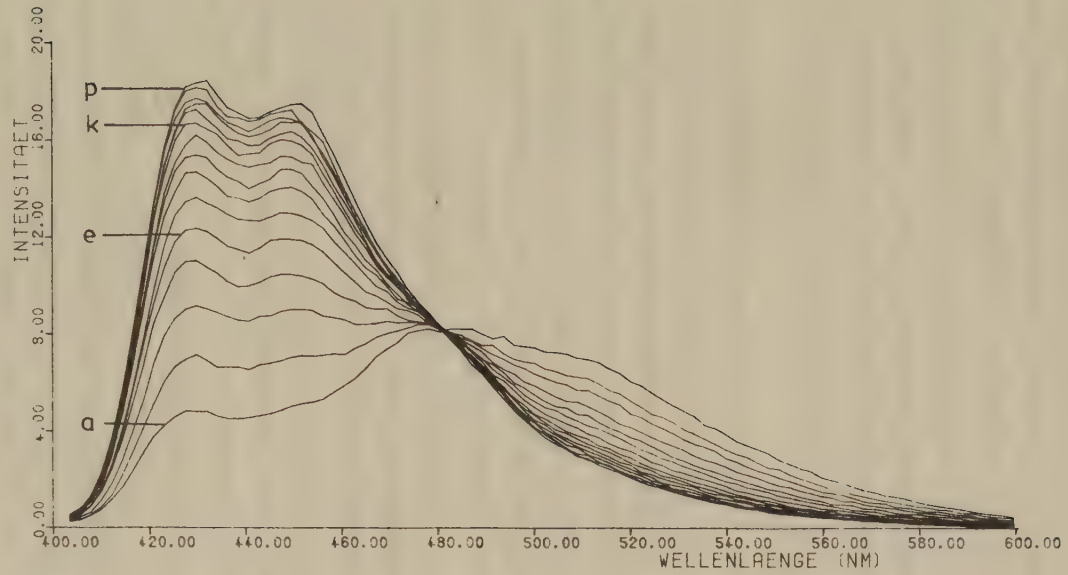


Abb. 6.7: Emissionsspektren während der Oxidation von Lucigenin
Scanzeit 93s; Anregungswellenlänge 369,2 nm; Reaktionsansatz A
Scanbeginn a: 0 min; e: 16 min; k: 36 min; p: 56 min

auftreten. Die Lumineszenz zeigt also ein Zweikomponentensystem an. Auch ein Einfluß der Chemilumineszenz ist auszuschließen. Ein meßbares Chemilumineszenzsignal würde sich, mit während der Reaktion abnehmender Intensität, zu den Fluoreszenzspektren addieren, was ein Auftreten isosbestischer Punkte verhinderte. Wie in Abschnitt 6.3 noch beschrieben werden wird, beträgt der Strahlungsfluß der Chemilumineszenz weniger als 1% des Fluoreszenzstrahlungsflusses.

Für jeden der 4 registrierten Reaktionsverläufe (Anregungs- und Emissionsspektren von 2 Ansätzen A und B) wurde eine separate kinetische Auswertung durchgeführt. Die Geschwindigkeitskonstanten k_A für die Abnahme des Lucigenins und k_E für die Zunahme des Methylacridons lassen sich nach den Gleichungen 6.2 und 6.4 bestimmen. Dazu mußte der jeweilige Konzentrationsverlauf $c_A(t)$ für Lucigenin und $c_E(t)$ für Methylacridon bekannt sein. Die Konzentrationen ließen sich für den beobachteten Zeitraum mit dem Programm KONZ berechnen, welches für alle Spektren eine iterative Anpassung nach Gleichung 6.7 durchführt. Zu einer genaueren Beschreibung des Auswertungsformalismus werden die mit dem Reaktionsansatz A erhaltenen Anregungsspektren gewählt:

Da k_A und k_E zu Beginn der Auswertung nicht bekannt sind, müssen zur Durchführung der kinetischen Korrektur zunächst Schätzwerte verwendet werden. Auf Grund der Annahme eines Reaktionsverlaufs Quasi-1.Ordnung sollten

k_A und k_E gleich sein, so daß die Ermittlung eines gemeinsamen Schätzwertes k' genügt. Aus den Fluoreszenzintensitäten bei 455 nm (Abb. 6.6) wurde für k' ein Wert von $1 \cdot 10^{-3}$/s gefunden. Bei 455 nm ist die Intensität des Methylacridons zu vernachlässigen.
Die kinetische Auswertung mit k' als Korrekturkonstanten ergibt die Ergebnisse:

$$k_A' = 8{,}95 \cdot 10^{-4}/s \qquad k_E' = 8{,}62 \cdot 10^{-4}/s$$

Die Auswertung mit k_A' und k_E' als Faktoren der kinetischen Korrektur nach Gleichung 6.7 führt zu denselben Geschwindigkeitskonstanten, so daß k_A' und k_E' den gesuchten Werten k_A und k_E entsprechen.
Dieses Ergebnis läßt die Vermutung zu, daß die berechneten Geschwindigkeitskonstanten unempfindlich gegenüber den zur Korrektur verwendeten Konstanten k' sind. Den Zusammenhang zwischen den Größen zeigt Tabelle 6.3 für 3 Faktoren k'. Neben den Geschwindigkeitskonstanten k_A' und k_E' sind die Anfangskonzentrationen c_A^o und c_E^o, die Endkonzentrationen c_A^e und c_E^e und die Reststreuungen s_A und s_E der kinetischen Anpassung nach Gleichung 6.2 bzw. 6.4 aufgeführt.
Für die untersuchten Werte wird durch die Tabelle nahezu Unabhängigkeit der iterativ ermittelten Geschwindigkeitskonstanten von der angewendeten Korrektur bei der Konzentrationsberechnung gezeigt. Auch die iterierten Endkonzentrationen für Lucigenin und Methylacridon, sowie

	ohne Korr. ($k'=0$)	$k'=9\cdot10^{-4}$/s	$k'=4\cdot10^{-3}$/s
k_A' [1/s]	$8{,}95\cdot10^{-4}$	$8{,}95\cdot10^{-4}$	$8{,}89\cdot10^{-4}$
c_A^o [mol/l]	$1{,}02\cdot10^{-6}$	$1{,}06\cdot10^{-6}$	$1{,}20\cdot10^{-6}$
c_A^e [mol/l]	$7{,}57\cdot10^{-9}$	$7{,}41\cdot10^{-9}$	$5{,}87\cdot10^{-9}$
s_A [mol/l]	$9{,}55\cdot10^{-9}$	$1{,}02\cdot10^{-8}$	$1{,}15\cdot10^{-8}$
k_E' [1/s]	$8{,}59\cdot10^{-4}$	$8{,}62\cdot10^{-4}$	$8{,}64\cdot10^{-4}$
c_E^o [mol/l]	$1{,}40\cdot10^{-6}$	$1{,}31\cdot10^{-4}$	$1{,}01\cdot10^{-4}$
c_E^e [mol/l]	$3{,}40\cdot10^{-6}$	$3{,}40\cdot10^{-6}$	$3{,}41\cdot10^{-6}$
s_E [mol/l]	$1{,}42\cdot10^{-8}$	$1{,}39\cdot10^{-8}$	$1{,}66\cdot10^{-8}$

Tabelle 6.3: Parameter der kinetischen Auswertung mit verschiedenen Korrekturkonstanten

die Reststreuungen zwischen gemessenen und berechneten Kurven sind nahezu identisch. Lediglich c_A^o und c_E^o unterscheiden sich. Es scheint also eine Abhängigkeit der berechneten Konzentrationen von k' vorzuliegen, die sich aber bei der Bestimmung von c_A und c_E aus allen, einen Reaktionsverlauf beschreibenden Spektren gleich auswirkt, so daß kein Einfluß auf die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten festzustellen ist. Auf diesen Zusammenhang zwischen Korrektur und Konzentrationsbestimmung soll später noch eingegangen werden (Tab. 6.4).
Auch die bei der Iteration nach c_A und c_E für jedes Spektrum verbleibende Reststreuung zeigt eine Abhängigkeit von k'. Dieses ist in Abbildung 6.8 gezeigt. Dazu sind

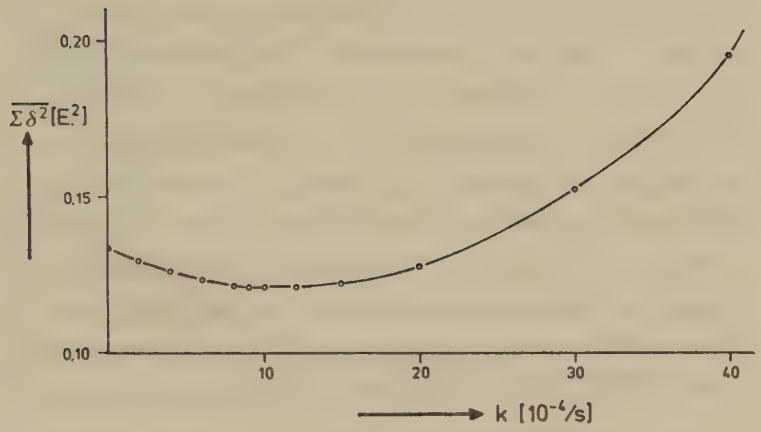


Abb. 6.8: Abhängigkeit der gemittelten Summen der Abweichungsquadrate von den zur Korrektur benutzten Geschwindigkeitskonstanten

die gemittelten Summen der Abweichungsquadrate der Spektren c bis m den zur Korrektur benutzten Geschwindigkeitskonstanten gegenübergestellt. Die Spektren a und b wurden nicht zur Auswertung herangezogen, da die Reaktion, wie in Abschnitt 6.3 gezeigt wird, eine Anlaufphase hat, während der sie sich nicht mit einem Ansatz 1. Ordnung beschreiben läßt. Auch die "späten" Spektren wurden nicht berücksichtigt, da sie, je weiter die Reaktion fortgeschritten ist, umso weniger Information zur Änderung der Konzentrationen beitragen.

Die gemittelten Summen der Abweichungsquadrate zeigen ein sehr breites Minimum bei $k'=9\cdot10^{-4}/s$, was in etwa dem Wert für k_A und k_E entspricht. Mit zunehmender Differenz von k' zu diesem Wert verschlechtert sich die Anpassung, da diese angenommene Änderungsgeschwindigkeit der Konzentrationen $c_A(t)$ und $c_E(t)$ während eines Scans nicht mehr der Reaktionsgeschwindigkeit entspricht.

Auf die in Tabelle 6.3 angegebenen Endkonzentrationen hat die kinetische Korrektur keinen Einfluß, da c_A^e und c_E^e für unendliche Reaktionszeit gelten, wo die Reaktionsgeschwindigkeit 0 ist. Die auftretenden Unterschiede der c_A^e liegen im Bereich von 10^{-10} mol/l und können vernachlässigt werden, da sie sich aus Zufälligkeiten beim Abbruch der Iteration ergeben.

Die Endkonzentrationen von $3,4\cdot10^{-6}$ mol/l Methylacridon weist auf eine Lucigeninkonzentration von $1,7\cdot10^{-6}$ mol/l in der Mischung hin. Das unterscheidet sich vom theoretischen Wert, der bei $1,67\cdot10^{-6}$ mol/l liegt, um weniger als 2% und befindet sich damit innerhalb der in Abschnitt 6.2.4.1 beschriebenen Streuung. Die iterativ ermittelte Endkonzentration c_A^e des Lucigenins kann im Rahmen der Meßgenauigkeit vernachlässigt werden. Die Umsetzung ist also vollständig.

Die Reststreuungen der 6 Anpassungen bewegen sich in einem Rahmen, der eine gute Übereinstimmung der Konzentrationsänderungen mit einem Mechanismus Quasi-1.Ordnung beweist. Das wird auch aus der Abbildung 6.9 deutlich,

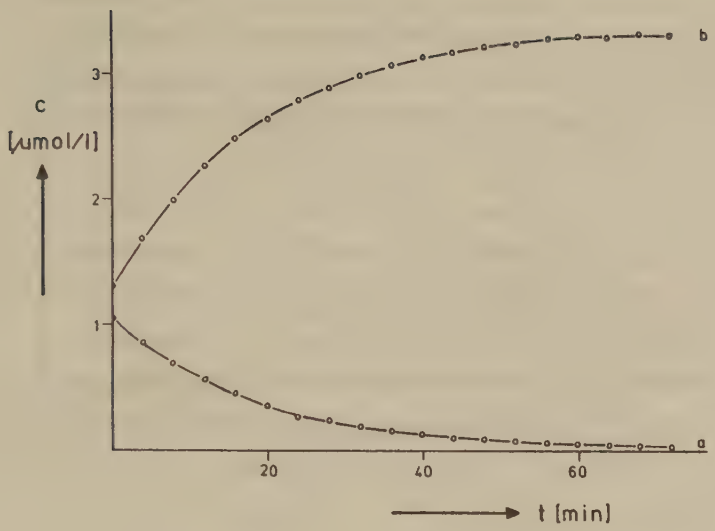


Abb. 6.9: Konzentrationsverlauf für Lucigenin (a) und Methylacridon (b) während der Reaktion

welche den gemessenen Konzentrationen die mit der Korrektur $k'=9\cdot10^{-4}/s$ berechneten Konzentrationswerte für Lucigenin und Methylacridon gegenüberstellt.

Tabelle 6.4 gibt die in Abbildung 6.9 dargestellten Konzentrationen, sowie die ohne Korrektur und mit $k'=4\cdot10^{-3}/s$ ermittelten Konzentrationen für jedes zweite registrierte Spektrum (Abb. 6.6) an. Aus den oben genannten Gründen werden die Spektren a und b nicht betrachtet.

Die Tabelle zeigt die Abhängigkeit der iterativ ermittelten Konzentrationen von k'. Die Konzentrationen der 3 Spalten beziehen sich dabei auf unterschiedliche Zeit-

Spektrum	Lucigeninkonzentration $[10^{-6}$mol/l]		
	ohne Korr.	$k'=9\cdot10^{-4}$/s	$k'=4\cdot10^{-3}$/s
c	1,01	1,05	1,19
e	0,67	0,70	0,76
g	0,44	0,45	0,52
i	0,26	0,27	0,31
l	0,18	0,19	0,22
n	0,12	0,13	0,15
p	0,09	0,09	0,11
	Methylacridonkonzentration $[10^{-6}$mol/l]		
c	1,41	1,32	1,02
e	2,07	2,02	1,81
g	2,54	2,50	2,38
i	2,82	2,80	2,72
l	3,02	3,01	2,96
n	3,16	3,15	3,13
p	3,24	3,24	3,23

Tabelle 6.4: Iterativ ermittelte Konzentrationen für Lucigenin und Methylacridon mit und ohne kinetische Korrektur

punkte während der Spektrenregistrierung. Diese Zeitpunkte werden durch die Größe von k' bestimmt. Nur wenn k' mit den wahren Geschwindigkeitskonstanten k_A und k_E identisch ist, wird dieser Zeitpunkt durch den Anfang der Spektrenregistrierung markiert. Aber auch für zwei aufeinanderfolgende Konzentrationen der mit anderen

Werten für k' erhaltenen Meßreihen beträgt die zugehörige zeitliche Differenz 4 min, so daß die sich aus allen Meßreihen ergebenden Geschwindigkeitskonstanten übereinstimmen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß für das hier vorliegende System, nämlich eine Reaktion Quasi-1.Ordnung, bei deren spektraler Verfolgung die Registrierzeit klein ist gegenüber der Halbwertszeit, eine kinetische Korrektur zur Bestimmung der Reaktionsparameter nicht notwendig ist. Die Halbwertszeit, die sich für eine Reaktion 1. Ordnung nach Gleichung 6.9 berechnet,

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_M} \qquad (6.9)$$

ist für $k_M = 8{,}78 \cdot 10^{-4}/s$, was dem Mittelwert von k_A und k_E bei der Korrektur mit $k' = 9 \cdot 10^{-4}/s$ entspricht, 789 s, während die Registrierzeit 93 s beträgt. Auch die Anwendung der Korrektur mit $k' = 4 \cdot 10^{-3}/s$, das bedeutet eine Halbwertszeit von 173s, bringt nur eine geringfügige Verschlechterung der Anpassung mit sich.

Kommt es jedoch darauf an, die während der Spektrenaufnahme vorliegenden Konzentrationen zu ermitteln, so ist eine Berücksichtigung der Konzentrationsänderungen während der Dauer der Registrierung unerläßlich. Denn nur bei richtiger Korrektur ergeben sich die Konzentrationen für einen vergleichbaren Zeitpunkt, wie ihn der Startpunkt der Aufnahme darstellt.

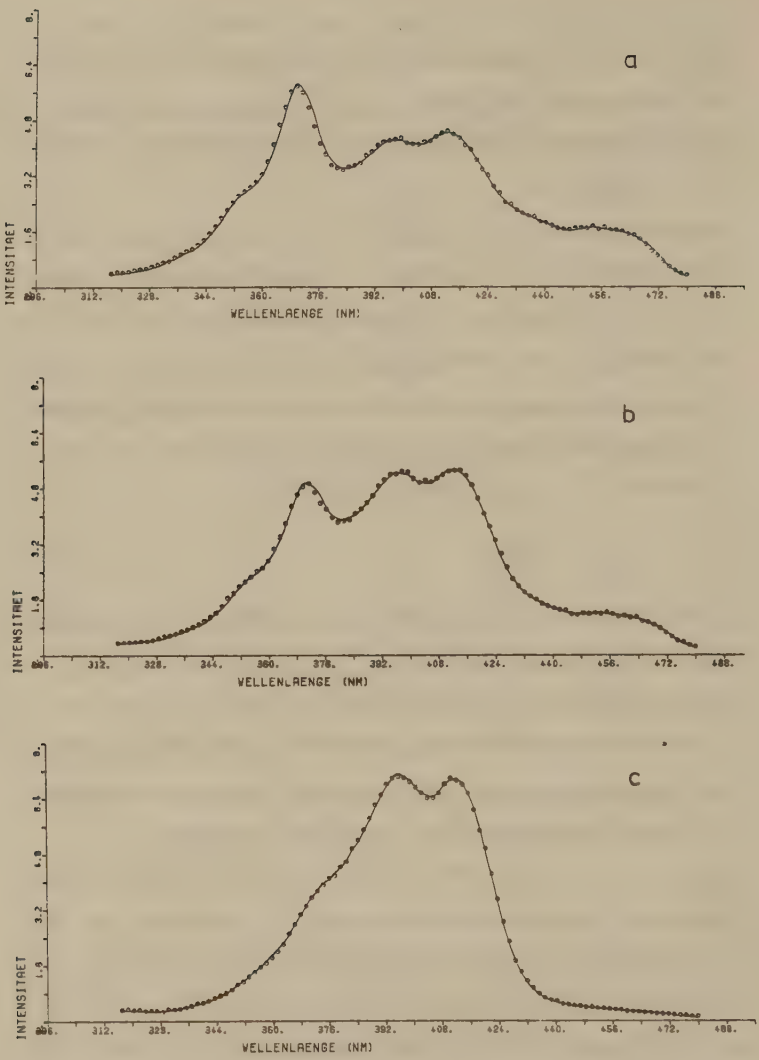


Abb. 6.10: Gemessene (o o o) und berechnete (---) Anregungsspektren während der Reaktion von Lucigenin zu Methylacridon

a) c_A = 1,05 µmol/l c_E = 1,32 µmol/l

b) c_A = 0,70 µmol/l c_E = 2,02 µmol/l

c) c_A = 0,09 µmol/l c_E = 3,24 µmol/l

Abbildung 6.10 gibt für verschiedene Konzentrationsverhältnisse von Lucigenin und Methylacridon die während der Reaktion aufgenommenen Anregungsspektren wieder. Neben den gemessenen Werten sind die mit den iterativ ermittelten Konzentrationen berechneten Spektren angegeben. Die Konzentrationen beziehen sich auf den Beginn der Registrierung des jeweiligen Spektrums. Es zeigt sich eine sehr gute Übereinstimmung zwischen gemessenen und berechneten Werten.
Auch die entsprechende Auswertung der Emissionsspektren ergibt die Konzentrationen für Lucigenin und Methylacridon über die Beobachtungszeit. Sie sind in Abbildung 6.11 dargestellt.

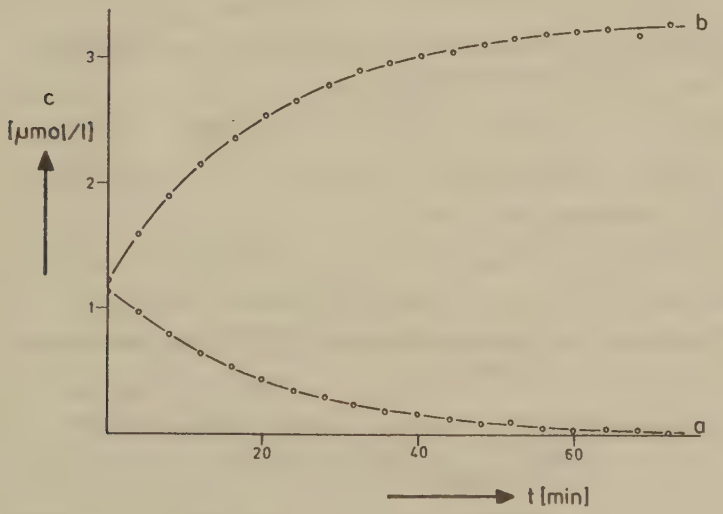


Abb. 6.11: Konzentrationsverlauf für Lucigenin (a) und Methylacridon (b) während der Reaktion

Wie für die Anregungsspektren auch, ließen sich aus den mit der Korrektur $k'=9\cdot10^{-4}/s$ erhaltenen Konzentrationen die Spektren berechnen. In Abbildung 6.12 sind für zwei Reaktionszeiten die gemessenen und berechneten Spektren für den Reaktionsansatz A dargestellt. Auch hier zeigt sich eine gute Übereinstimmung zwischen gemessenen und berechneten Spektren. Die Reststreuungen liegen in derselben Größenordnung, wie sie für die Anregungsspektren angegeben wurden.

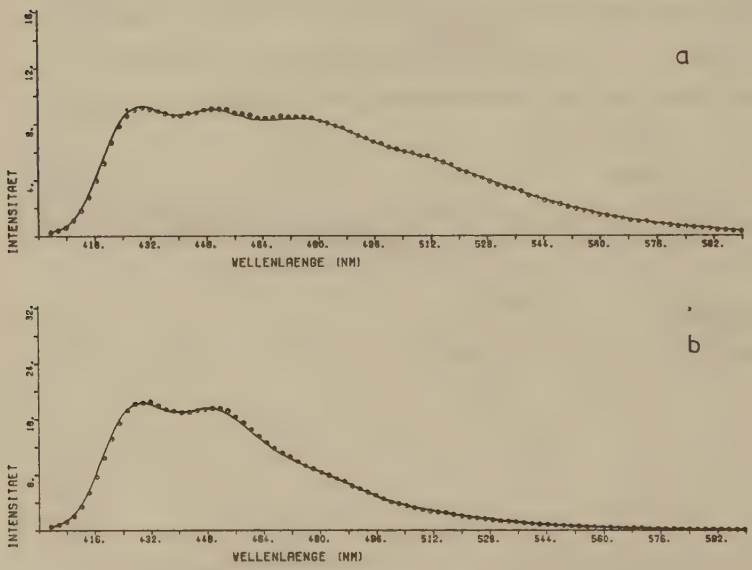


Abb. 6.12: Gemessene (o o o) und berechnete (——) Emissionsspektren während der Reaktion von Lucigenin zu Methylacridon

a) c_A = 0,98 µmol/l c_E = 1,60 µmol/l

b) c_A = 0,11 µmol/l c_E = 3,17 µmol/l

Die Auswertung der Spektren des Reaktionsansatzes B zeigt, daß sich auch hier der Umsatz durch den gleichen Ansatz beschreiben läßt. Die aus Anregungs- und Emissionsspektren mit beiden Reaktionsansätzen erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten k_A und k_E gibt Tabelle 6.5 wieder.

Reaktionsansatz	Art	k_A [10^{-4}/s]	k_E [10^{-4}/s]
A	Anregung	8,95	8,62
A	Emission	8,14	8,13
B	Anregung	8,29	7,84
B	Emission	8,48	7,53

Tabelle 6.5: Berechnete Geschwindigkeitskonstanten

Der Mittelwert der Geschwindigkeitskonstanten liegt bei $8{,}25 \cdot 10^{-4}$/s, die Streuung der Werte beträgt $4{,}46 \cdot 10^{-5}$/s. Es zeigt sich, daß auch die Einstellung einer höheren Lucigeninkonzentration in der Reaktionsmischung die gleiche Geschwindigkeitskonstante ergibt. Das war für eine Reaktion Quasi-1.Ordnung zu erwarten, deren Geschwindigkeit unabhängig von der Anfangskonzentration sein muß.

Zwar sind Unterschiede zwischen k_A und k_E für denselben Reaktionsansatz festzustellen, sie sind aber nicht signifikant. Wie die Abbildungen 6.9 und 6.11 zeigen, sind für alle der zur Auswertung herangezogenen Reaktions-

zeiten die Konzentrationen des Methylacridons größer als die des Lucigenins. Dazu kommt bei Auswertung der Emissionsspektren noch ein großer Unterschied in der Quantenausbeute zugunsten des Methylacridons, so daß hier die Gesamtemission fast nur durch das Endprodukt bestimmt wird, was größere Unsicherheiten bei der Berechnung der Lucigeninkonzentration zur Folge hat. Darauf ist wohl auch der Unterschied zwischen k_A und k_E gerade bei der Auswertung der Emissionsspektren des Reaktionsansatzes B zurückzuführen.

6.2.6. Bestimmung der Nachweisgrenzen

Die Bevorzugung der quantitativen Bestimmung des Methylacridons gegenüber der des Lucigenins bei der Analyse eines Gemischs mit Hilfe der Emissionsspektren ergibt sich auch bei einem Vergleich der Nachweisgrenzen. Zu deren Ermittlung wurde die Lösungsmittelfluoreszenz durch die Aufnahme von je 15 Blindspektren bei den in Abschnitt 6.2.4 angegebenen Meßbedingungen für die Anregungs- und Emissionsspektren der Substanzen bestimmt. Für jedes dieser Spektren ließen sich mit dem Auswerteformalismus fiktive Konzentrationen an Lucigenin und Methylacridon berechnen. Aus den Standardabweichungen der Konzentrationsstreuungen werden die Nachweisgrenzen $\underline{c}_A$ und $\underline{c}_E$ nach Gleichung 6.10 für beide Komponenten bei beiden Auswerte-

verfahren erhalten. Ist s_{Bl} die Standardabweichung des Blindwertes, so ergibt sich die Nachweisgrenze $\underline{c}$ zu (65):

$$\underline{c} = 3 \cdot \sqrt{2} \cdot s_{Bl} \text{ (für die Einzelmessung)} \quad (6.10)$$

Tabelle 6.6 zeigt die Werte für $\underline{c}_A$ und $\underline{c}_E$.

	$\underline{c}_A$ [mol/l]	$\underline{c}_E$ [mol/l]
Anregung	$1{,}38 \cdot 10^{-8}$	$1{,}69 \cdot 10^{-8}$
Emission	$1{,}23 \cdot 10^{-8}$	$7{,}34 \cdot 10^{-9}$

Tabelle 6.6: Nachweisgrenzen für Lucigenin und Methylacridon aus Anregungs- und Emissionsspektren

Während die sich aus den Anregungsspektren ergebenden Nachweisgrenzen für Lucigenin und Methylacridon etwa gleich sind, zeigt sich bei Verwendung der Emissionsspektren eine größere Differenz, die auf die in Abschnitt 6.2.5 angegebenen Gründe zurückzuführen ist.

Die hier aufgeführten Nachweisgrenzen für Lucigenin sind auch die minimalen Werte, bis zu denen noch eine Auswertung der Konzentrations-Zeit-Beziehung sinnvoll ist. Die Hinzunahme weiterer Wertepaare von Reaktionszeit und zugehöriger Konzentration bringt keine weitere Information für die Bestimmung der kinetischen Parameter. Wie die Abbildungen 6.9 und 6.11 zeigen, läßt sich aber die Kinetik der Lucigeninabnahme bis in die Nähe der Nachweisgrenze mit guter Anpassung verfolgen.

6.3. Die Chemilumineszenz des Reaktionssystems

6.3.1. Das Meßverfahren

Die Registrierung von Chemilumineszenzspektren wurde mit dem Emissionsteil des Fluorimeters durchgeführt. Die Meßbedingungen und die Datenerfassung waren denen der Fluoreszenzmessungen gleich. Allerdings ist die bei Verwendung der Spaltversion 2 erreichbare Intensität sehr gering. Auch bei Vermessung des Reaktionsansatzes 8 lassen sich bei höchster Verstärkung nur Intensitätswerte von maximal 100 relativen Einheiten registrieren, was 10% des dynamischen Bereichs entspricht. Da sich die spektrale Verteilung der Chemilumineszenz in einer sehr breiten Bande ausdrückt, konnte die Spaltversion 5 verwendet werden, ohne daß viel der spektralen Information verloren ging. Es ließ sich jedoch eine Steigerung der Intensität um einen Faktor von etwa 10 erreichen.

Während sich bei der Fluoreszenzmessung Summenspektren von Anfangs- und Endprodukt ergeben, handelt es sich bei der Chemilumineszenz um eine Emission, deren spektrale Verteilung nur einer Komponente des Reaktionssystems (Zwischen- oder Endprodukt) entspricht. Sind Energieübertragungen zu anderen Komponenten, deren Konzentrationen sich mit der Reaktionszeit ändern, zu vernachlässigen, so sollte die Abnahmegeschwindigkeit der Chemilumineszenzintensität unabhängig von der Emissionswellenlänge sein.

Wird diese Unabhängigkeit für das zu untersuchende System gefunden, reicht es, die Reaktion nur bei einer Emissionswellenlänge zu verfolgen. Hierzu kann das Maximum der Bande bei der Spaltversion mit dem höchsten spektralen Strahlungsfluß beobachtet werden. Eine Monochromatorsteuerung braucht dann nicht durchgeführt zu werden. Dadurch vereinfacht sich das Datenerfassungsprogramm für den Mikrorechner. Auch die Erzeugung definierter Zeitintervalle läßt sich softwaremäßig realisieren, indem das Datenerfassungsprogramm den Rechner zwischen der Registrierung zweier Meßpunkte eine Warteschleife n-mal durchlaufen läßt. Da jeder Durchlauf eine Zehntelsekunde dauert, kann der zeitliche Meßpunktabstand mit eben dieser Auflösung durch Wahl von n eingestellt werden.

6.3.2. Kinetik der Chemilumineszenz

Die spektrale Verteilung der Chemilumineszenzintensität, sowie ihre zeitliche Abnahme sind in Abbildung 6.13 dargestellt. Zu ihrer Messung wurde der Reaktionsansatz B gewählt, der einen 10 mal höheren Strahlungsfluß als Ansatz A erbrachte. Trotzdem mußte die höchste Verstärkung eingestellt werden. Der zeitliche Abstand zwischen den Spektren beträgt 4 Minuten.
Das Chemilumineszenzspektrum der Oxidation des Lucigenins besteht aus einer breiten Bande, die ein Maximum bei

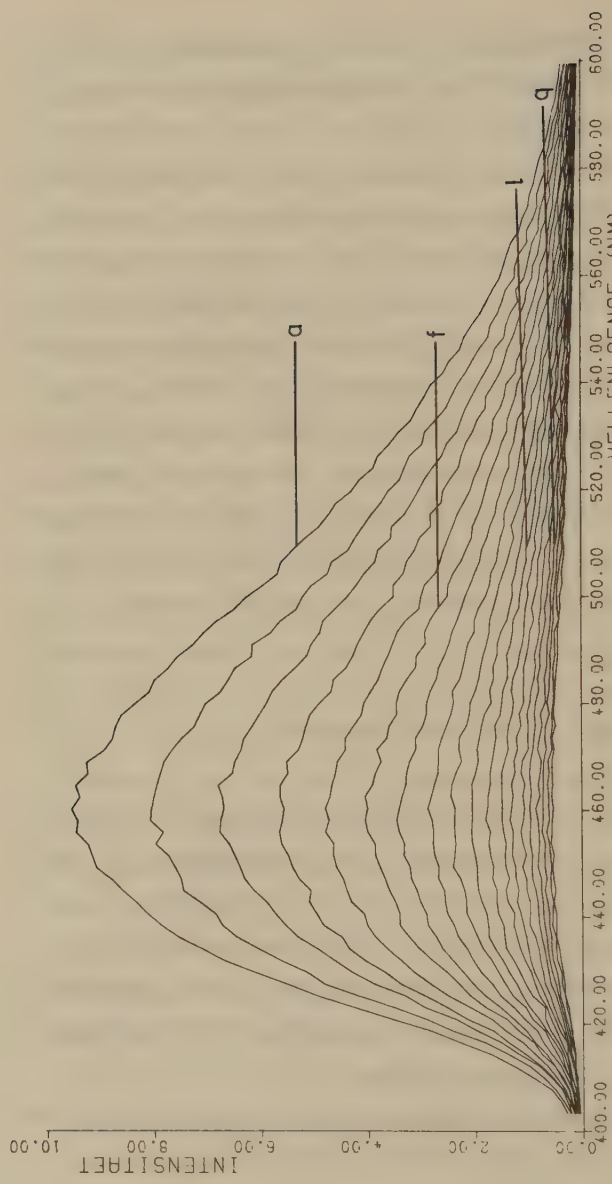


Abb. 6.13: Chemilumineszenzspektren während der Oxidation von Lucigenin
zeitlicher Abstand der Spektren: 4 min
Scanzeit 93s; Reaktionsansatz B
Scanbeginn a: 0 min; f: 20 min; l: 40 min; q: 60 min

etwa 461 nm aufweist. Die Struktur der Spektren hat keine Ähnlichkeit mit einem aus einer Mischung aus Lucigenin und Methylacridon erhaltenen Emissionsspektrum, wie sich aus einem Vergleich der Abbildung 6.13 mit 6.7 ergibt, wo Spektren verschiedener Konzentrationsverhältnisse dargestellt sind. Die These, daß Methylacridon das primär leuchtende Produkt ist, wobei die Verschiebung der Bandenlage auf Energieübertragung zum Lucigenin zurückzuführen ist, kann also verworfen werden. Hierauf wird bei der Diskussion des Reaktionsmechanismus noch eingegangen werden.

Zur Untersuchung, ob die Abnahmegeschwindigkeit der Chemilumineszenzintensität unabhängig von der Emissionswellenlänge ist, wurden die Geschwindigkeitskonstanten an 3 verschiedenen Wellenlängen der Bande bestimmt. Es ergaben sich folgende Werte:

Emissionswellenlänge [nm]	423,2	460,5	528,8
Geschwindigkeitskonstante $[10^{-4}/s]$	7,5	7,5	7,9

Tabelle 6.7: Geschwindigkeitskonstanten für die Abnahme der Chemilumineszenzintensität

Diese Werte sind etwas kleiner als die fluorimetrisch ermittelte Geschwindigkeitskonstante von $8{,}25 \cdot 10^{-4}/s$. Wird allerdings die dort berechnete Streuung $(4{,}5 \cdot 10^{-5}/s)$

zugrunde gelegt, so ist kein signifikanter Unterschied der drei Werte untereinander festzustellen. Die Intensitätsabnahme ist also unabhängig von der Beobachtungswellenlänge, so daß es möglich ist, die Bestimmung der kinetischen Parameter aus Chemilumineszenzmessungen durch Registrierung der Gesamtintensität während der Reaktionszeit durchzuführen.

Um einen statistischen Vergleich der fluorimetrisch ermittelten Geschwindigkeitskonstanten mit den aus Chemilumineszenzmessungen bestimmten zu ermöglichen, wurden Mittelwert k_C und Standardabweichung s_C der Geschwindigkeitskonstanten aus 10 Messungen der Abnahme der Chemilumineszenzintensität bestimmt. Die mit dem Reaktionsansatz B bei 28°C durchgeführte Umsetzung wurde bei 460 nm mit der Spaltversion 5 beobachtet. Es ergaben sich die Ergebnisse:

$$k_C = 7{,}97 \cdot 10^{-4}/s \qquad s_C = 0{,}40 \cdot 10^{-4}/s$$

Ein F-Test zwischen dieser Standardabweichung und der aus den Fluoreszenzspektren ermittelten, s_F, zeigt, daß s_C zwar kleiner ist, daß aber kein signifikanter Unterschied besteht, denn der F-Wert

$$F = \frac{s_F^2}{s_C^2} = 1{,}23$$

ist kleiner als der für 7 und 9 Freiheitsgrade tabellierte Wert für das 95%-Niveau von 3,29. Da in s_F,

zusätzlich zu den auch s_C bestimmenden Faktoren, noch die Anfahrgenauigkeit der Monochromatoren eingeht, läßt sich hieraus schließen, daß diese apparativ gegebene Fehlerquelle nicht signifikant zur Streuung der Meßergebnisse beiträgt.

Der Vergleich der mittleren Geschwindigkeitskonstanten k_F und k_C läßt sich mit der Hypothese durchführen, daß es sich bei beiden Meßreihen um unabhängige Stichproben einer gleichen, normalverteilten Grundgesamtheit handelt, deren Varianz nicht bekannt ist, aber durch s_F^2 und s_C^2 abgeschätzt werden kann. Für den t-Wert gilt hier (78):

$$t = \frac{|k_F - k_C|}{\sqrt{(n_F-1)\cdot s_F^2 + (n_C-1)\cdot s_C^2}} \cdot \sqrt{\frac{n_F \cdot n_C \cdot (n_F+n_C-2)}{n_F + n_C}} \qquad (6.11)$$

Für n_F=8 und n_C=10, was die Anzahl der Werte pro Meßreihe darstellt, ergibt sich ein Ergebnis von t=1,40. Dieser Wert liegt unter der für 16 Freiheitsgrade tabellierten Angabe für das 95%-Niveau von 1,75, so daß auch hier kein signifikanter Unterschied besteht.

Die Auswertung des Reaktionsverlaufs ist nicht vom Zeitpunkt des Mischens der Reagenzien an durchführbar. Während einer Anlaufphase, die bei der unkatalysierten Reaktion etwa 5 min dauert, vergrößert sich die Reaktionsgeschwindigkeit, um erst anschließend exponentiell abzunehmen. Im Konzentrations-Zeit-Diagramm macht sich das durch einen Wendepunkt bemerkbar, während die Chemi-

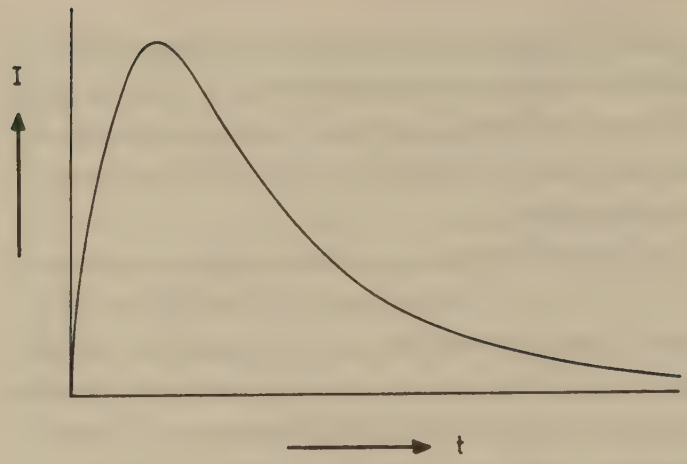


Abb. 6.14: Schema des zeitlichen Verlaufs der Chemilumineszenzintensität

lumineszenzintensität, die ja die Ableitung der c-t-Kurve darstellt, ein Maximum durchläuft, wie Abbildung 6.14 schematisch zeigt.

Die Kinetik der Anlaufphase, sowie Intensität und zeitliche Lage des Maximums wurden hier nicht weiter ausgewertet, denn zum einen ließ sich die Reaktion nicht von Anfang an beobachten, da keine Messungen während des Mischens durchgeführt werden konnten, und zum anderen dauerte es trotz Vortemperierung etwa 2 Minuten, bis das Reaktionsgemisch die im Küvettenraum eingestellte Temperatur angenommen hatte. Während der Reaktion ließ sich die Temperatur mit $\pm$ 0,2°C konstant halten.

Zur Auswertung des nach einem Gesetz Quasi-1.-Ordnung ablaufenden Teils der kinetischen Kurve durften nur Werte herangezogen werden, die zeitlich genügend weit vom Maximum entfernt lagen. Ein Kriterium hierfür lieferte die Reststreuung zwischen gemessener und berechneter Kurve, die sich bei Hinzunahme eines Punktes, der noch nicht im Bereich des exponentiellen Abfalls liegt, merklich vergrößert.

Das wird durch Abbildung 6.15 verdeutlicht. Dargestellt sind die während der Reaktion im Abstand von 5 min gemessenen Chemilumineszenzintensitäten in Abhängigkeit von der Reaktionszeit Δt. Der Anfang der Zeitmessung ($\Delta t=0$) wurde dabei willkürlich gewählt; der zugehörige Intensitätswert liegt in der Nähe des Maximums. Die gesamte Intensitäts-Zeit-Kurve verhält sich so, wie in Abbildung 6.14 schematisch gezeigt ist.

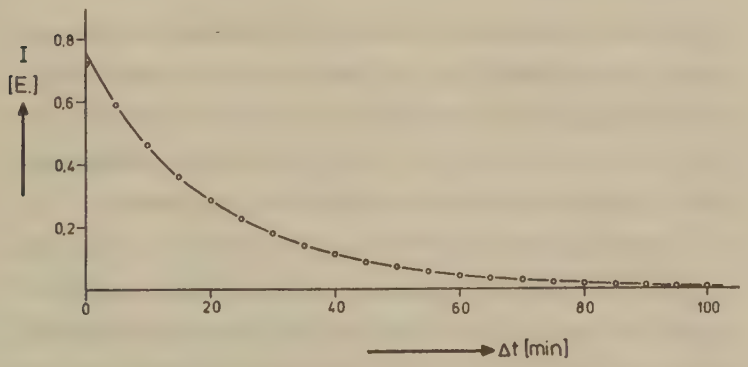


Abb. 6.15: Abhängigkeit der Chemilumineszenzintensität von der Reaktionszeit
o gemessene Werte
– berechnete Werte (Regression über I(Δt=5min) bis I(Δt=100min))

Über die den Zeiten Δt=5min bis Δt=100min zugehörigen Werte wurde eine Regression nach Gleichung 6.2 vorgenommen. Es zeigt sich eine sehr gute Anpassung der gemessenen Intensitäten an die in Abbildung 6.15 dargestellte Exponentialfunktion, deren Abnahme durch die Geschwindigkeitskonstante k von $8{,}1 \cdot 10^{-4}$/s beschrieben wird. Die Reststreuung beträgt $1{,}2 \cdot 10^{-3}$ relative Einheiten.

Die Regression bei Hinzunahme des Wertes für Δt=0min ergibt eine Geschwindigkeitskonstante von $7{,}9 \cdot 10^{-4}$/s und eine Reststreuung von $4{,}6 \cdot 10^{-3}$ relativen Einheiten. Ein F-Test zeigt, daß zwischen beiden Reststreuungen ein hochsignifikanter Unterschied besteht, denn der F-Wert

$$F = \frac{21{,}20}{1{,}44} = 14{,}7$$

liegt höher als der für 18 und 17 Freiheitsgrade tabellierte Wert von 3,22 für das 99%-Niveau. Die Anzahl der Freiheitsgrade berechnet sich hier bei M Meßwerten als M-3, da nach Gleichung 6.2 nicht nur nach k sondern auch nach Anfangs- und Endkonzentration iteriert wird.

Der auswertbare Zeitraum der Reaktionskurve beginnt also erst bei t=5 min. Der Wert für t=0 min liegt zu nahe am hier nicht dargestellten Maximum der Intensitäts-Zeit-Kurve, als daß er für die kinetische Auswertung nach dem Algorithmus einer Reaktion Quasi-1.Ordnung benutzt werden könnte.

6.3.3. Korrektur der Chemilumineszenzspektren

Die Struktur des Chemilumineszenzspektrums, wie es sich in Abbildung 6.13 darstellt, wird neben der spektralen Intensitätsverteilung des Reaktionsleuchtens durch die optischen Eigenschaften des Emissionsmonochromators, sowie die Empfindlichkeitsverteilung des Empfängers bestimmt. Mit Hilfe geeigneter Standards, deren wahre Emissionsspektren bekannt sind, läßt sich eine Funktion $F(\lambda)$ durch Vergleich der gemessenen mit den theoretischen Spektren (79) finden, mit der sich diese Geräteparameter korrigieren lassen. Die Korrekturfunktion ergibt sich zu:

$$F(\lambda) = \frac{I_w(\lambda)}{I_g(\lambda)} \qquad (6.12)$$

Dabei stellt I_w die tabellierte wahre Intensität und I_g die gemessene Intensität bei der Wellenlänge λ dar. Verschiedene Standards decken hier unterschiedliche Wellenlängenbereiche ab.

Zur Bestimmung von $F(\lambda)$ im Bereich von 400-600 nm bietet sich in 0,1N Schwefelsäure gelöstes Chininsulfat an, dessen Emissionsspektrum sich über dieses Intervall erstreckt. Die für die in der Literatur angegebenen Wellenlängen bestimmten Funktionswerte $F(\lambda)$ sind im Anhang wiedergegeben. Durch lineare Interpolation ließen sich die den bei der Chemilumineszenzmessung angefahrenen

Wellenlängen zugehörigen Funktionswerte erhalten. Das in Abbildung 6.16 dargestellte, korrigierte Chemilumineszenzspektrum B ergibt sich durch Multiplikation der gemessenen Intensitäten mit den entsprechenden $F(\lambda)$. Wie die Abbildung zeigt, hat es sich in seiner Struktur gegenüber dem unkorrigierten Spektrum A kaum verändert, allerdings hat sich das Maximum auf etwa 468 nm verschoben. Aus der kurzwelligsten Emissionsstrahlung von etwa 400 nm berechnet sich nach Gleichung 3.1 eine freiwerdende Reaktionsenthalpie von mindestens 299,3 kJ/mol (71,6 kcal/mol).

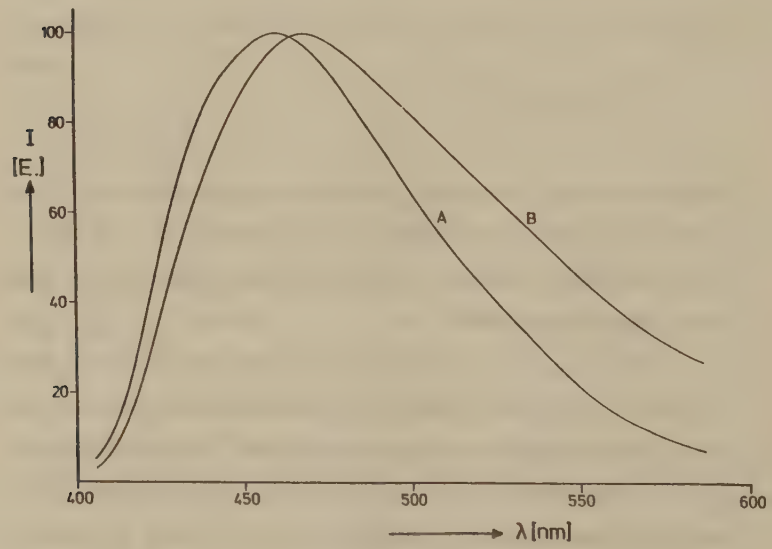


Abb. 6.16: Gemessenes (A) und korrigiertes (B) Chemilumineszenzspektrum der Oxidation von Lucigenin durch H_2O_2 in alkalischer Lösung

6.4. Anwendung der Lucigenin-Chemilumineszenz zur katalytischen Kobaltbestimmung

Die Oxidation des Lucigenins mit H_2O_2 wird durch viele Metalle katalysiert (80). Die Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit bewirkt auch gleichzeitig eine Erhöhung der Chemilumineszenzintensität. Beide Effekte lassen sich zur quantitativen Analyse des Katalysators heranziehen.

Im folgenden Abschnitt soll die Erstellung einer Vorschrift zur Analyse von Kobaltionen beschrieben werden, wobei die Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten von der Katalysatorkonzentration genutzt werden soll.

6.4.1. Theorien des Mechanismus

Die Katalyse der Oxidation des Lucigenins durch Kobaltionen beruht vermutlich auf der durch das Metall bewirkten schnelleren Zersetzung des H_2O_2. Diese verläuft unter Bildung von $OH^{\bullet}$- und $HO_2^{\bullet}$-Radikalen (81) und läßt sich schematisch durch folgende Summengleichungen chrakterisieren:

$$2\ Co(II) + H_2O_2 \rightleftharpoons 2\ Co(III) + 2\ OH^-$$

$$2\ Co(III) + H_2O_2 + 2\ OH^- \rightleftharpoons 2\ Co(II) + O_2 + 2\ H_2O$$

Sowohl Kobalt(II)- wie Kobalt(III)-Verbindungen sind in alkalischem Milieu schwer löslich. Bei Anwesenheit von

H_2O_2 bildet sich jedoch der lösliche Komplex $Co^{3+} \cdot HO_2^-$ (82). (Burdo und Seitz (83) postulieren den analogen Komplex des zweiwertigen Kobalts, $Co^{2+} \cdot HO_2^-$, als nicht notwendige Zwischenstufe eines möglichen Mechanismus der Oxidation des Luminols durch H_2O_2 bei Katalyse durch Kobaltionen. Es werden allerdings keine physikalischen Konstanten des Komplexes angegeben.)
Das Verhältnis zwischen freien Ionen, Komplexen und ausgefällten Verbindungen ist stark pH-abhängig, was auch den Einfluß der OH^--Konzentration auf die Zersetzungsgeschwindigkeit erklärt. Da sich eine ähnliche Abhängigkeit für die Chemilumineszenzintensität finden ließ (70), muß ein Zusammenhang zwischen beiden Reaktionen angenommen werden. Eine weitergehende Diskussion dieses Problems soll im Anschluß an die Beschreibung einiger Experimente zur Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Lucigeninoxidation von pH-Wert und H_2O_2-Konzentration erfolgen.

6.4.2. Bestimmung der kinetischen Daten bei Variation der Reaktionsparameter

Der Zusatz des Katalysators, hier $CoSO_4$ in H_2O, zum Reaktionsgemisch wurde mit einer Mikroliterspritze vorgenommen. Auf diese Weise blieben die Konzentrationen der anderen Reaktionspartner konstant, und es ließ sich ein direkter Vergleich mit den Ergebnissen der unkata-

lysierten Reaktion durchführen. Da sich die Reaktion, wie Abschnitt 6.3 gezeigt hat, durch die Abnahme der Chemilumineszenzintensität ebenso gut wie durch die Änderung der Konzentrationen verfolgen läßt, wurde auch die Ermittlung der Geschwindigkeit der katalysierten Reaktion auf diese Weise vorgenommen.

Die Reabsorption des emittierten Lichts durch die Kobaltionen läßt sich bei einem Extinktionskoeffizienten von 3 $l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ vernachlässigen. Bei der höchsten eingestellten Kobaltkonzentration von $4{,}7 \cdot 10^{-6}$ mol/l beträgt die Extinktion $1{,}4 \cdot 10^{-5}$ bei einer Schichtdicke von 1 cm. Es ließ sich auch kein Einfluß des Kobalts auf die Lage des Maximums der Chemilumineszenzbande feststellen, was die Beobachtung von Ryan u.a.(55) bestätigt.

Sowohl für die unkatalysierte Reaktion, wie für einige Katalysatorzusätze wurden die Geschwindigkeitskonstanten für verschiedene H_2O_2- und NaOH- Konzentrationen bestimmt.

a) Variation der H_2O_2-Konzentration

Die für verschiedene H_2O_2- und Co^{2+}- Konzentrationen ermittelten Geschwindigkeitskonstanten sind in Tabelle 6.8 angegeben. Die Anfangskonzentration an Lucigenin betrug dabei immer $1{,}67 \cdot 10^{-5}$ mol/l, die NaOH-Konzentration war 0,033 mol/l. Das entsprach den Werten des Reaktionsansatzes B.

Die graphische Darstellung der Geschwindigkeitskonstanten in Abbildung 6.17 zeigt für die unkatalysierte Reaktion

$c_{H_2O_2}$ [mmol/l]	Geschw.-Konst.: k [10^{-4}/s]			
	$c_{Co^{2+}}$ [µmol/l]			
	0	0,67	1,33	2,67
0	---	---	---	---
4	3,2	3,2	7,5	8,1
6	5,3	5,3	10,7	10,5
8	6,4	6,9	12,5	17,3
10	8,0	9,9	13,3	21,4
20	14,0	20,0	23,4	31,6
30	16,9	27,9	34,7	42,0
40	20,1	28,7	37,5	49,5
50	20,5	29,9	39,3	54,9
60	20,5	27,4	36,7	49,3
80	19,3	25,7	33,5	35,8
100	19,9	23,5	25,6	31,9

Tabelle 6.8: Geschwindigkeitskonstanten der Luc.-Oxidation für verschiedene H_2O_2- und Co^{2+}-Konzentrationen

einen Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit bei Erhöhung der H_2O_2-Konzentration, bis bei etwa 40 mmol/l ein Grenzwert erreicht wird. Da bei Abwesenheit von Katalysatoren der Zerfall des H_2O_2 in alkalischer Lösung an der Glaswand der Küvette stattfindet (84), wird dieser Grenzwert durch die maximal mögliche Diffusionsgeschwindigkeit der Moleküle zu den aktiven Zentren der Glaswand hin, bzw. der Rückdiffusion der Zersetzungsprodukte von der Wand weg, bestimmt. Der komplizierte Zerfallsmechanismus

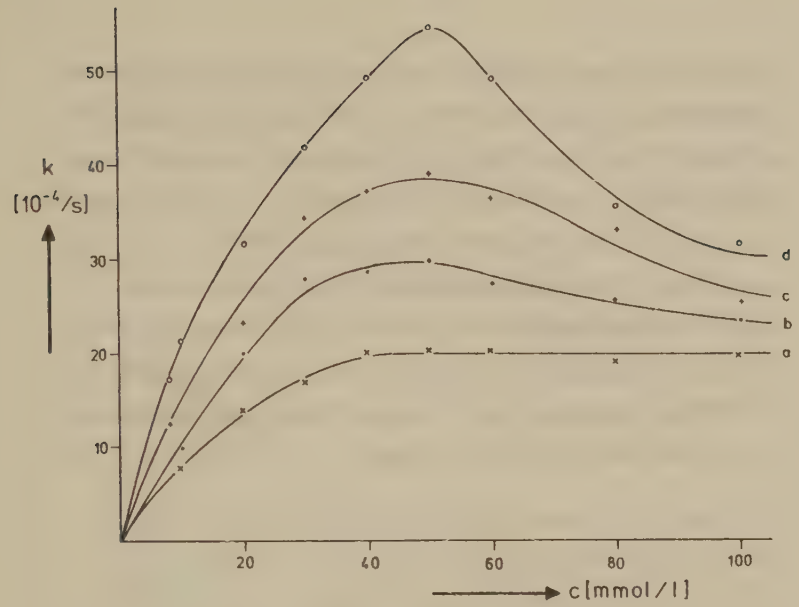


Abb. 6.17: Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten der Luc.-Oxidation von der H_2O_2-Konzentration
a: kein Co^{2+}; b: $c_{Co}2+$ = 0,67 µmol/l;
c: $c_{Co}2+$ = 1,33 µmol/l; d: $c_{Co}2+$ = 2,67 µmol/l

hängt dabei vom pH-Wert und vom benutzten Glas ab, wobei auch das Verhältnis von benetzter Oberfläche zu Volumen des Reaktionsraums eine Rolle spielt.
Die Reaktionsgeschwindigkeit der katalysierten Umsetzung durchläuft ein Maximum bei einer H_2O_2-Konzentration von etwa 50 mmol/l, das sich mit steigender Co^{2+}-Konzentration immer stärker ausprägt. Der ansteigenden Exponentialfunktion ist hier eine mit zunehmender H_2O_2-Konzentration abnehmende Funktion überlagert. Sie läßt sich möglicher-

weise darauf zurückführen, daß mit steigender H_2O_2-Konzentration das Co(II)-Co(III)-Gleichgewicht stärker zu Co(III) verschoben ist. Dadurch erhöht sich die Wahrscheinlichkeit der Bildung von unlöslichem $Co(OH)_3$, was zur Verarmung der Lösung an Katalysator führt.
Eine ausführliche Diskussion des Reaktionsmechanismus findet sich in Abschnitt 6.5. Hier bleibt festzuhalten, daß die günstigste H_2O_2-Konzentration für die quantitative Kobaltbestimmung bei 50 mmol/l liegt, da sich dabei die höchste Empfindlichkeit ergibt.

b) Variation der NaOH-Konzentration
Der Einfluß der NaOH-Konzentration und damit des pH-Wertes auf die Reaktionsgeschwindigkeit wird durch die Tabelle 6.9 aufgezeigt.

c_{NaOH} [mmol/l]	pH	k [10^{-4}/s]	
		$c_{Co^{2+}}$ [µmol/l]	
		0	2,67
3,3	11,52	2,8	7,5
6,7	11,82	4,3	14,0
13,3	12,12	6,2	19,0
20,0	12,30	7,2	20,6
26,7	12,43	7,8	20,6
33,3	12,52	8,0	21,4
66,6	12,82	8,0	20,3
133,3	13,12	7,5	21,5
200,0	13,30	8,5	21,9

Tabelle 6.9: Geschwindigkeitskonstanten der Luc.-Oxidation bei verschiedenen pH-Werten

Dabei sind sowohl die Geschwindigkeitskonstanten der unkatalysierten Reaktion dargestellt, wie auch die bei einer relativ hohen Kobaltkonzentration von 2,67 µmol/l erhaltenen. Die H_2O_2-Konzentration betrug 10 mmol/l, die Lucigeninkonzentration war $1{,}67 \cdot 10^{-5}$ mol/l.
Wie die Auftragungen in Abbildung 6.18 zeigen, ergeben sich für die katalysierte und die unkatalysierte Reaktion ähnliche Abhängigkeiten der Geschwindigkeitskonstanten vom pH-Wert. Beide erreichen einen maximalen Grenzwert bei einem pH-Wert von etwa 12,5.

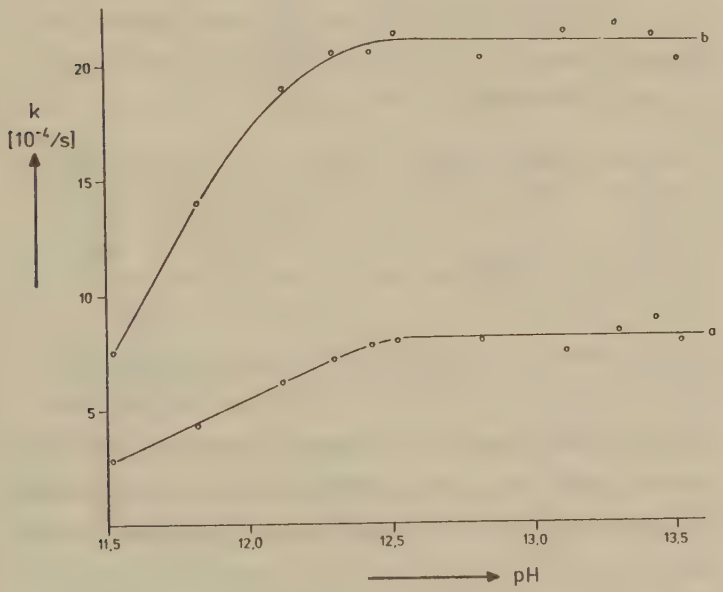


Abb. 6.18: Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten der Luc.-Oxidation vom pH-Wert
a: kein Co^{2+}; b: $c_{Co^{2+}}$ = 2,67 µmol/l

Für die quantitative Kobaltanalyse sollte also ein pH-Wert, der größer als 12,5 ist, eingestellt werden. Neben der hohen Empfindlichkeit ist hier die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der NaOH-Konzentration gering, so daß sich Fehler bei der Herstellung und Verdünnung der NaOH-Lösungen nicht bemerkbar machen.

6.4.3. Vorschrift zur quantitativen Analyse von Kobalt(II)-Ionen

Die Aufstellung einer Eichkurve zur quantitativen Analyse der Kobaltionen wurde mit folgender Reaktionsmischung durchgeführt:

1 ml	$5 \cdot 10^{-5}$ M Lucigenin	===>	c= $1{,}67 \cdot 10^{-5}$ mol/l
1 ml	0,1 M NaOH	===>	c= $3{,}33 \cdot 10^{-2}$ mol/l
0,5 ml	0,3 M H_2O_2	===>	c= $5{,}0 \cdot 10^{-2}$ mol/l
0,5 ml	H_2O		

Hierzu wurden verschiedene Kobaltmengen gegeben, deren Volumen sich aber im µl-Bereich bewegte, so daß keine Konzentrationsänderung der anderen Komponenten hervorgerufen wurde. Die Chemilumineszenzintensität der Reaktion ließ sich bei 460 nm registrieren. Die Temperatur betrug 28°C.

Die hier ermittelten Geschwindigkeitskonstanten finden sich in Tabelle 6.10. Es handelt sich dabei um Mittel-

werte aus jeweils 2 oder 3 Einzelmessungen. Die Berechnung des Wertes ohne Katalysatorzusatz ist weiter unten erläutert.

$c_{Co^{2+}}$ [µmol/l]	k [10^{-4}/s]
0	20,5
0,133	21,7
0,400	23,7
0,667	29,9
1,333	39,3
2,000	45,3
2,667	54,9
3,333	66,2
4,000	73,5
4,667	85,2

Tabelle 6.10: Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten der Luc.-Oxidation von der Co^{2+}-Konzentration

Die daraus resultierende Eichgerade ergibt sich nach linearer Regression zu

$$k = 13{,}56 \cdot 10^{-4} \cdot c_{Co^{2+}} + 20{,}5 \cdot 10^{-4}$$

mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,9983. Sie ist in Abbildung 6.19 dargestellt.
Zur Bestimmung der Nachweisgrenze der Kobaltionen wurden die Geschwindigkeitskonstanten von 10 Experimenten bei den oben angegebenen Konzentrationen ohne Katalysatorzusatz berechnet.

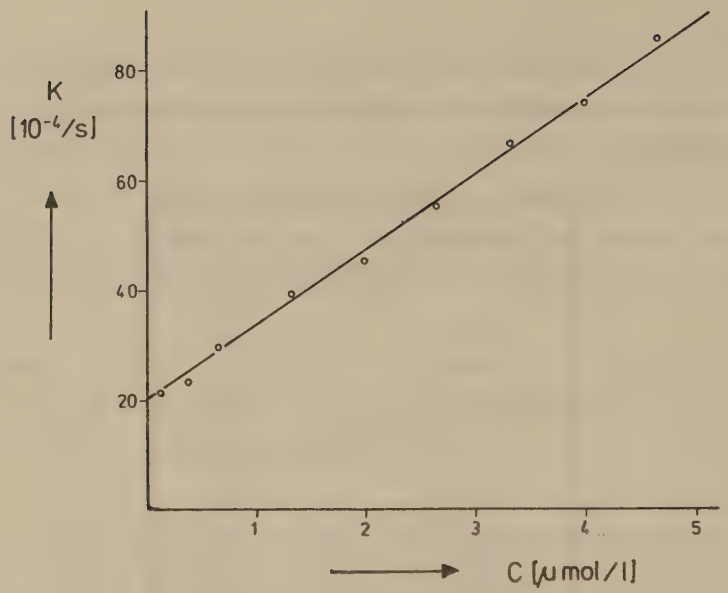


Abb. 6.19: Eichgerade zur katalytischen Kobaltbestimmung

Es ergaben sich für den Mittelwert $\bar{k}$ und die Standardabweichung s_k:

$$\bar{k} = 20{,}47 \cdot 10^{-4}/s \qquad s_k = 0{,}962 \cdot 10^{-4}/s$$

Daraus folgt für die Geschwindigkeitskonstante an der Nachweisgrenze:

$$\underline{k} = 3 \cdot \sqrt{2} \cdot s_k + \bar{k} \qquad (6.13)$$

$$\underline{k} = 24{,}55 \cdot 10^{-4}/s$$

Das entspricht einer Kobaltkonzentration von 0,3 µmol/l, die sich aus der Empfindlichkeit (Steigung) der Eich-

geraden ergibt. Die in der mit insgesamt 3 ml gefüllten Küvette vorhandene Kobaltmenge folgt daraus zu 0,9 nmol bzw. 53,2 ng oder 17,7 ng/g. Damit liegt die Nachweisgrenze in der Größenordnung der auch mit anderen Verfahren wie AAS oder AES erreichbaren Werte. Ein quantitativer Vergleich ist wegen der verschiedenen Definitionen der Nachweisgrenze schwierig.

Die Streuung der Geschwindigkeitskonstanten ist neben Fehlern beim Ansetzen der Reaktionsmischungen hauptsächlich auf Schwankungen der Zersetzungsgeschwindigkeit des H_2O_2 zurückzuführen. Da diese Zersetzung durch Verunreinigungen und aktive Stellen auf der Küvettenoberfläche bewirkt wird, läßt sich durch entsprechende Reinigung der beteiligten Substanzen bzw. Desaktivierung des Glases sicherlich eine Verbesserung der Nachweisgrenze erreichen. Die Herabsetzung der absoluten Menge von 53,2 ng wäre durch die Reduzierung des eingesetzten Probenvolumens möglich, wobei die Konzentrationen allerdings konstant bleiben müssen. Zur Detektion muß dann eine andere Küvette mit einer entsprechend geänderten Beobachtungsoptik benutzt werden.

6.5. Diskussion des Reaktionsmechanismus

Auch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen lassen keine gesicherte Aufstellung eines Reaktionsmechanismus der Oxidation des Lucigenins durch H_2O_2 in alkalischer Lösung zu. Im folgenden sollen jedoch noch einmal einige Beobachtungen zusammengestellt und interpretiert werden.

Wird Lucigenin mit OH^--Ionen versetzt, so ist eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zu beobachten, die sich mit dem Stern-Volmer-Gesetz beschreiben läßt. Da sich im Absorptionsspektrum keine Änderungen zeigen, kann eine Umsetzung des Lucigenins mit den OH^--Ionen zu einer Carbinolbase oder eines ihrer Spaltprodukte ausgeschlossen werden. Wahrscheinlicher ist ein Mechanismus für die Fluoreszenzlöschung, der über einen Charge-Transfer-Komplex verläuft und von Legg und Hercules (85) allgemein für das Quenching der Lucigeninfluoreszenz durch Elektronendonatoren aufgestellt wurde. Er läuft nach dem in Abbildung 6.20 dargestellten Schema ab.

Liegt das niedrigste, mit einem Elektronenpaar besetzte, Energieniveau des Elektronendonators, hier OH^-, zwischen Grund- und 1. angeregten Niveau des Lucigenins, so kann ein Übergang eines dieser Elektronen zum Grundniveau des angeregten Lucigenins stattfinden. Anschließend füllt das angeregte Elektron des Lucigenins die im OH^--Elektronenpaar entstandene Lücke auf, so daß sich die Elek-

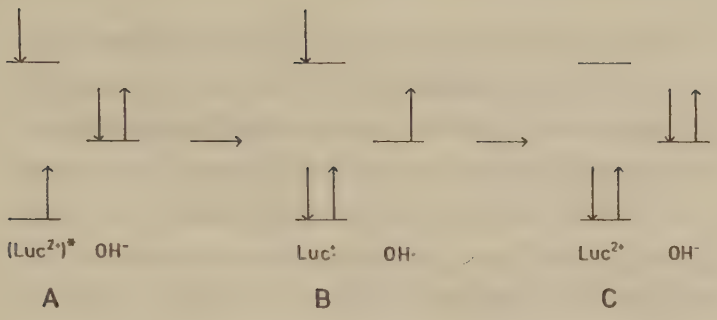


Abb. 6.20: Orbitalschema des Löschvorgangs der Lucigeninfluoreszenz

tronen beider Moleküle wieder im Grundzustand befinden, ohne daß Fluoreszenzstrahlung emittiert worden ist. Für diesen Mechanismus spricht ebenfalls die Tatsache, daß sich Quenching der Lucigeninfluoreszenz durch Elektronenakzeptoren nicht feststellen ließ. So ist auch keine Intensitätslöschung durch Sauerstoff zu beobachten.

Auf Grund dieser Beobachtungen können alle Theorien des Reaktionsmechanismus für die Oxidation des Lucigenins verworfen werden, die auf einer Umsetzung der Carbinolbase beruhen. Da keine Anlagerung der OH^--Ionen an Lucigenin stattfindet, erscheint es auch unwahrscheinlich, daß die Reaktion über ein Zwischenprodukt verläuft, welches aus der Anlagerung von HO_2^--Ionen an das Dikation entsteht.

Denkbar bleibt der von Maeda postulierte Mechanismus, welcher über einen Charge-Transfer-Komplex als Zwischen-

stufe führt. Sind die Energieniveaus des angeregten Lucigenins und des OH^--Grundzustandes nicht sehr unterschiedlich, so wird sich nach der Boltzmann-Verteilung auch eine endliche Konzentration an Radikalkation und Diradikal einstellen. Das entspricht der Umwandlung von C zu B in Abbildung 6.20, bzw. der weiteren Umsetzung des Radikalkations mit einem zweiten OH^--Anion. Dabei ist die Wahrscheinlichkeit der Bildung des Radikalkations grösser als die der Weiterreaktion zum Diradikal.
Wie in Abschnitt 6.1 beschrieben ist, schloß Maeda (73) aus Versuchen mit molekularem Sauerstoff als Oxidationsmittel, daß sich das Diradikal mit dem paramagnetischen Sauerstoff zu dem Dioxetan verbindet, welches dann zu Methylacridon zerfällt. Bei Verwendung von H_2O_2 als Oxidationsmittel kann ein gleicher Reaktionsmechanismus mit dem aus dem Zerfall resultierenden Sauerstoff angenommen werden. Die Ergebnisse der kinetischen Experimente können dies aber nicht völlig bestätigen.
Ein Vergleich der aus Fluoreszenz- und Chemilumineszenzmessungen erhaltenen Ergebnisse zeigt, daß der Abfall der Chemilumineszenzintensität und die Bildung des Methylacridons mit der gleichen Geschwindigkeit wie die Abnahme der Lucigeninkonzentration erfolgen. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt muß also am Anfang der Reaktionsfolge liegen, weil sonst längerlebige Zwischenprodukte auftreten müßten. Diese wurden aber nicht beobachtet. Auch das Auftreten der isosbestischen Punkte bei

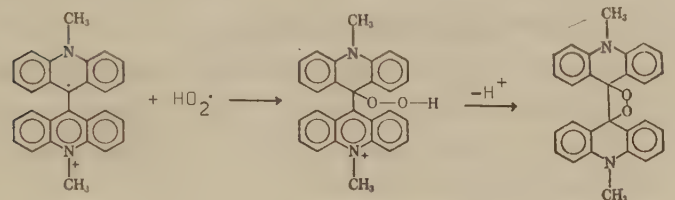
der Darstellung der Fluoreszenzspektren läßt auf eine direkte Umsetzung schließen. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt kann einmal die Anlagerung des Sauerstoffs an das Diradikal sein, während als zweite Möglichkeit die Bildung des Sauerstoffs zu nennen wäre, der dann sofort mit dem Diradikal weiterreagiert. Dieser Möglichkeit ist dabei der Vorzug zu geben, da eine Radikalreaktion im allgemeinen sehr schnell verläuft. Das abreagierte Diradikal würde in beiden Fällen in einem schnellen Prozeß durch das mit ihm im Gleichgewicht stehende Lucigenin ersetzt, so daß sich die Gesamtreaktion durch die Abnahme des Lucigenins verfolgen läßt.

Der Zerfall des H_2O_2 läßt sich über die Abnahme der Extinktion bei ca. 300 nm verfolgen. Für die benutzten Konzentrationen befindet sich bei dieser Wellenlänge die langwellige Flanke der starken Absorption im UV-Bereich. Es zeigte sich, daß sowohl für die katalysierte, wie die unkatalysierte Reaktion der Zerfall wesentlich langsamer als die den Konzentrationsverhältnissen entsprechende Oxidation des Lucigenins vor sich geht. Während der Dauer der chemilumineszierenden Reaktion kann die Zerfallsgeschwindigkeit als konstant angesehen werden. Daraus folgt aber, daß die Sauerstoffkonzentration im Reaktionsraum kontinuierlich steigt, weil ja die Konzentration des den Sauerstoff verbrauchenden Lucigenins fortwährend abnimmt. Durch Konkurrenzreaktionen, welche ebenfalls Sauerstoff verbrauchen, wie die — allerdings

nur bei der katalysierten Reaktion mögliche Oxidation des Co^{2+} durch O_2 oder die Rückbildung von H_2O_2 aus H_2O und O_2, wird die Sauerstoffkonzentration zwar ebenfalls beeinflußt, ob sich jedoch eine konstante Konzentration einstellt, erscheint zweifelhaft. Denn eine leichte Änderung der Reaktionsbedingungen würde kaum eine solch starke Verschiebung der im Reaktionssystem befindlichen konstanten Sauerstoffkonzentration hervorrufen, welche diese große beobachtete Geschwindigkeitsänderung rechtfertigte.

Bei sich während der Reaktion ändernder Sauerstoffkonzentration dürfte die Geschwindigkeit der Oxidation aber nicht nach dem beobachteten Mechanismus 1. Ordnung verlaufen, sondern sie müßte sich mit fortlaufender Reaktionszeit ebenso ändern, es sei denn, der Sauerstoffverbrauch der Reaktion verliefe nach einem Mechanismus 0. Ordnung. Die starke Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von den Anfangskonzentrationen an H_2O_2, NaOH und Co^{2+} läßt aber eine Unabhängigkeit vom H_2O_2-Zerfall, die sich in einem Mechanismus 0. Ordnung ausdrückte, recht unwahrscheinlich erscheinen.
Ein ähnlicher Mechanismus, wie Maeda ihn für die Oxidation mit molekularem Sauerstoff beschreibt, ist bei Berücksichtigung des beim H_2O_2-Zerfall entstehenden $HO_2^{\bullet}$-Radikals denkbar. Dessen Konzentration kann unter der Annahme eines konstanten Zerfalls des Peroxids als quasistationär angesehen werden, da sich Entstehung und Abreaktion durch Rekombination, Verbindung mit dem

gleichfalls entstehenden $OH^{\bullet}$-Radikal oder Reduktion durch Co^{2+} zum HO_2^--Ion die Waage halten.
Durch Anlagerung eines solchen Radikals an das Radikalkation des Lucigenins und anschließende Abspaltung eines H^+-Ions würde ebenfalls das Dioxetan entstehen:

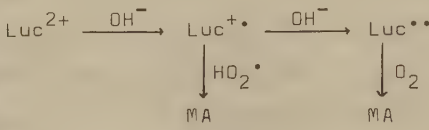


Für den Reaktionsverlauf ergibt sich dabei eine Geschwindigkeit von:

$$-\left(\frac{dc}{dt}\right)_{Luc} = k \cdot c_{Luc} \cdot c_{HO_2^{\bullet}}$$

wobei eine konstante $HO_2^{\bullet}$-Konzentration die beobachtete Kinetik nach einem Mechanismus Quasi-1.-Ordnung erklärt. Die Abhängigkeit der Konzentration des freien Radikals von den eingesetzten Reagenzien drückt sich dabei in den unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten aus.
Dieser Reaktionsweg über das Radikalkation des Lucigenins erscheint auch noch aus dem Grund wahrscheinlich, als es, wie mit der ESR-Spektroskopie nachgewiesen werden konnte, als Zwischenprodukt bei der Bildung des Diradikals auftritt. Bei Anwesenheit von $HO_2^{\bullet}$-Radikalen wird die stark exotherme Abreaktion zum Methylacridon energetisch

sicherlich günstiger sein, als die Bildung einer zweiten Charge-Transfer-Verbindung zum Diradikal. Die Verwendung von Sauerstoff als Oxidationsmittel läßt den Weg über das Diradikal wieder wahrscheinlicher werden, so daß sich schematisch folgende Möglichkeiten ergeben:



MA steht hier für Methylacridon.

Die vollständige Analyse des Reaktionsmechanismus ist mit Hilfe der optischen Spektroskopie allein nicht möglich. Neben den Konzentrationen von Anfangs- und Endprodukt müssen auch die beteiligten Radikale einwandfrei bestimmt und kinetisch erfaßt werden (z.B. durch ESR-Spektroskopie). Da Material und Geometrie des Reaktionsraums für den H_2O_2-Zerfall eine große Rolle spielen, sollten dabei möglichst alle Messungen, auch unterschiedlicher Verfahren, unter Bedingungen durchgeführt werden, die einen reproduzierbaren Zerfall des Peroxids gewährleisten und so einen Vergleich ermöglichen. Auch die Analyse des Reaktionsbeginns, wo die Geschwindigkeit noch ansteigt, kann zur Aufklärung des Mechanismus beitragen. Sie kann durch Anwendung spezieller Mischverfahren ermöglicht werden.

Die Natur der chemilumineszierenden Substanz läßt sich mit optischen Methoden allein ebenfalls nicht aufklären.

Allerdings kann mit großer Sicherheit der vielfach angenommene Mechanismus der Energieübertragung von angeregtem Methylacridon zu Lucigenin und Emission eines Überlagerungsspektrums ausgeschlossen werden. Auch bei der Bearbeitung dieses Problems sollte sich durch kombinierte Anwendung physikalisch-chemischer Methoden eine Lösung erzielen lassen. Möglicherweise finden sich auch hier Einflüsse angeregter Triplettzustände, die auch beim Zerfall vieler anderer Dioxetane entstehen, wie in Abschnitt 3 beschrieben worden ist.

7. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Entwicklung eines lumineszenzspektroskopischen Verfahrens zur Untersuchung zeitabhängiger Systeme. Als Beispiel wurde die chemilumineszierende Oxidation von Lucigenin (Bis-N-methyl-acridinium-nitrat) durch Wasserstoffperoxid und Natronlauge zu Methylacridon gewählt. Diese Reaktion läßt sich sowohl über die Änderung der Chemilumineszenzintensität als auch fluorimetrisch verfolgen, da Ausgangsverbindung wie Endprodukt fluoreszieren.

a) Ein konventionelles Spektralfluorimeter wurde so erweitert, daß sich die Möglichkeit der digitalen Monochromatorsteuerung und Datenerfassung ergab. Dazu wurden Schrittmotoren verwendet, die hardwaremäßig über eine externe Logik und softwaremäßig mit Hilfe eines Mikrorechners angesteuert wurden. Die von einem A/D-Wandler umgesetzten Intensitätsdaten wurden mit dem Mikrorechner erfaßt, dessen Peripherie (Kassettengerät) eine längerfristige Ablegung der Daten ermöglichte.
   Zur Ausgabe der Daten standen ein Drucker, ein X/Y-Schreiber und eine Lochstreifenstanze zur Verfügung. Mit Hilfe der Lochstreifen wurde eine Datenübertragung auf einen Großrechner vorgenommen, mit dem die Auswertung der Experimente durchgeführt wurde.

Die zur Datenerfassung sowie zur Steuerung der oben genannten Prozesse benötigte Software wurde in der Maschinensprache des Mikrorechners erstellt.

b) Für beide Monochromatorantriebe wurden die Kalibrierungsfunktionen zwischen Wellenlänge und zugehöriger Schrittzahl ermittelt, wobei von einem definierten Startpunkt der Motoren aus gezählt wurde.
Die Genauigkeit der Monochromatorsteuerung wurde festgelegt, ebenso andere wichtige Geräteparameter, wie Intensitätsabhängigkeit des Rauschens, Zeitkonstante des Empfängersystems, spektrale Spaltbreiten und die Geometrie des Teils der Küvette, dessen Emission mit der gegebenen optischen Anordnung erfaßt wird.
Zur Verringerung von innerem Filtereffekt und Reabsorption wurde die Küvettenanordnung so geändert, daß sich eine Verkleinerung der Schichten ergab, welche nicht zum registrierten Fluoreszenzstrahlungsfluß der Probe beitrugen, die aber Anregungs- und Emissionslicht absorbierten.

c) Zur Berechnung von Fluoreszenzintensitäten wurde ein einfacher mathematischer Ausdruck aufgestellt. Der Einfluß von innerem Filtereffekt und Reabsorption wurde durch eine Näherung berücksichtigt. Der Algorithmus wurde durch Vergleich zwischen gemessenen und berechneten Fluoreszenzstrahlungsflüssen von Anthracen überprüft. Im Bereich der Eindeutigkeit der Konzen-

trations-Intensitäts-Kurve, d.h. unterhalb der maximalen Intensität, betrugen die Abweichungen weniger als 5 %, was die Anwendbarkeit des benutzten Modells zeigte.

d) Der unter c) beschriebene mathematische Ausdruck wurde zur Anwendung auf ein Zweikomponentensystem erweitert, wobei innerer Filtereffekt und Reabsorption durch beide Komponenten berücksichtigt wurden. Mit Hilfe eines Simplex-Programms ließen sich bei bekannten Fluoreszenzintensitäten die Konzentrationen der Komponenten berechnen, wobei eine Regression über vollständige Spektren vorgenommen wurde. Das dazu notwendige Fortran-Programm wurde auf der Großrechenanlage erstellt.

e) Aus den während der Umsetzung von Lucigenin zu Methylacridon registrierten Anregungs- und Emissionsspektren konnten mit Hilfe des angegebenen Algorithmus die zeitabhängigen Konzentrationen von Ausgangskomponente und Endprodukt bestimmt werden. Die Auswertung mit einem Gauß-Newton-Verfahren erlaubte die Bestimmung der kinetischen Parameter. Eine Verbesserung der so durchgeführten Zweikomponentenanalyse ergab sich bei Korrektur der Spektren für die Konzentrationsänderungen während der Registrierung.
Es zeigte sich, daß beide Vorgänge, nämlich die Abnahme des Lucigenins und die Zunahme des Methyl-

acridons mit der gleichen Geschwindigkeit nach einem Mechanismus Quasi-1.-Ordnung verlaufen, wenn H_2O_2 und NaOH im Überschuß vorhanden sind.
Die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten aus Anregungs- und Emissionsspektren für $c_{H_2O_2}$=0,01 mol/l und c_{NaOH}=0,033 mol/l (pH=11,5) ergab für verschiedene Anfangskonzentrationen an Lucigenin einen Mittelwert von $8{,}25 \cdot 10^{-4}$/s. Die Streuung der ermittelten Geschwindigkeitskonstanten betrug $4{,}5 \cdot 10^{-5}$/s (T=28°C).

f) Die Auswertung der wesentlich lichtschwächeren Chemilumineszenzspektren ergab, daß sich deren Intensitätsabnahme mit den gleichen kinetischen Parametern beschreiben läßt. Der Mittelwert der Geschwindigkeitskonstanten beträgt $7{,}97 \cdot 10^{-4}$/s, die Standardabweichung ist $4{,}0 \cdot 10^{-5}$/s. Beide Werte unterscheiden sich nicht signifikant von den fluorimetrisch ermittelten Daten.
Die Korrektur der Chemilumineszenzspektren mit den Faktoren, welche die spektrale Charakteristik von Emissionsmonochromator und Empfänger beschreiben, ergab ein Maximum der Chemilumineszenz bei 468 nm.

g) Die Eigenschaft von Kobaltionen, katalytisch auf die Lucigeninoxidation zu wirken, ließ sich zu ihrer quantitativen Analyse benutzen. Nach Festlegung der optimalen Konzentrationen der Reagenzien wurde die Eichgerade der Geschwindigkeitskonstanten als Funktion

der Kobaltkonzentration aufgestellt. Aus der Empfindlichkeit (Steigung) der Eichgeraden ergab sich eine Nachweisgrenze von 0,3 µmol/l.

h) Die beobachtete Löschung der Fluoreszenzintensität des Lucigenins durch Natronlauge ließ sich durch die Bildung eines Charge-Transfer-Komplexes im elektronisch angeregten Zustand erklären.
Ausgehend von einem Charge-Transfer-Komplex zwischen dem Lucigenin-Dikation und OH^--Anionen ließ sich auf Grund der kinetischen Ergebnisse ein möglicher Mechanismus der Reaktion zu Methylacridon aufstellen.

8. Literaturverzeichnis

(1) Lumb, D. — Luminescence Spectroscopy
Academic Press, London New York
San Francisco 1978

(2) Wehry, E.L. — Modern Fluorescence Spectroscopy
Vol. 1,2, Heyden, London New York
Rheine 1976

(3) Guilbault, G.G. — Practical Fluorescence, M. Dekker
New York 1973

(4) Schulman, S.G. — Fluorescence and Phosphorescence
Spectroscopy
Pergamon, Elmsford New York 1977

(5) Cormier, M.J.
Hercules, D.M.
Lee, J. — Chemiluminescence and Bioluminescence
Plenum Press, New York 1973

(6) Gundermann, K.D. — Chemilumineszenz organischer
Verbindungen
Springer Verlag
Berlin Heidelberg New York 1968

(7) Aghaizu, D.K.N. — Dissertation, Bochum 1976

(8) Thommes, G.A.
Leininger, E. — Talanta
7, 181 (1961)

(9) Sawicki, E. — Talanta
16, 1231 (1969)

(10) Sawicki, E.
Stanley, T.W.
Elbert, W.C. — Talanta
11, 1433 (1964)

(11) Zander, M.
Breymann, U.
Dreeskamp, H.
Koch, E. — Z. Naturforsch.
32a, 1561 (1977)

(12) Breymann, U. Z. Anal. Chem.
Dreeskamp, H. 285, 208 (1978)
Koch, E.
Zander, M.

(13) Heinrich, G. Z. Anal. Chem.
Güsten, H. 278, 257 (1976)

(14) Zander, M. Z. Anal. Chem.
228, 352 (1967)

(15) Zander, M. Z. Anal. Chem.
263, 19 (1973)

(16) Schenk, G.H. Anal. Chem.
Wirz, D.R. 42, 1754 (1970)

(17) Lübbers, D. Naturwissenschaften
Niesel, W. 44, 59 (1957)

(18) Green, G.L. Anal. Chem.
O'Haver, T.C. 46, 2191 (1974)

(19) O'Haver, T.C. Anal. Chem.
51, 91a (1979)

(20) Giering, L.P. Amer. Lab
Horning, A.W. 113, 1301 (1977)

(21) Rho, J.H. Anal. Chem.
Stuart, J.C. 50, 620 (1978)

(22) Jonsson, J.Å. Anal. Chem.
Callis, J.B. 48, 747 (1977)
Christian, G.D.

(23) Warner, I.M. Anal. Chim. Acta
Fogarty, M.P. 108, 361 (1979)
Smelly, D.C.

(24) Warner, I.M. Anal. Chem.
Davidson, E.R. 49, 2155 (1977)
Christian, G.D.

(25) Ho, C.N.
Christian, G.D.
Davidson, E.R.
Anal. Chem.
50, 1105 (1978)

(26) Moses, H.
Diplomarbeit, Bochum 1979

(27) Weiner, E.R.
Anal. Chem.
50, 1583 (1978)

(28) Vo-Dinh, T.
Anal. Chem.
50, 396 (1978)

(29) Holland, J.F.
Teets, R.E.
Kelly, P.M.
Timnick, A.
Anal. Chem.
49, 706 (1977)

(30) Jacob, R.
Diplomarbeit, Bochum 1976

(31) Leese, R.A.
Wehry, E.L.
Anal. Chem.
50, 1193 (1978)

(32) Demas, J.N.
Crosby, G.A.
J. Phys. Chem.
75, 991 (1971)

(33) Christmann, D.R.
Crouch, S.R.
Holland, J.F.
Timnick, A.
Anal. Chem.
52, 291 (1980)

(34) Mode, V.A.
Sissons, D.H.
Anal. Chem.
46, 200 (1974)

(35) Baumann, W.
Z. Anal. Chem.
284, 31 (1977)

(36) Engelhardt, H.
Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York 1977

(37) Weuster, W.
Specker, H.
Z. Anal. Chem.
293, 301 (1978)

(38) Zech, K.
Voelter, W.
Chromatographia
8, 350 (1975)

(39) Freed, D.J.
Faulkner, L.R.
Anal. Chem.
44, 1194 (1972)

(40) Burchfield, H.P.
Green, E.E.
Wheeler, R.J.
Billedeau, S.M.
J. Chrom.
99, 697 (1974)

(41) Bowman, M.C.
Beroza, M.
Anal. Chem.
40, 535 (1968)

(42) Bobrowski, R.
Diplomarbeit, Bochum 1977

(43) Staat, H.
Dissertation, Bochum 1975

(44) Klukas, F.
Dissertation, Bochum 1978

(45) Weisz, H.
Angew. Chem.
6, 177 (1976)

(46) Müller, H.
Werner, G.
Z. Chem.
16, 304 (1976)

(47) Gauglitz, G.
Reule, A.
Z. Anal. Chem.
276, 98 (1975)

(48) Gundermann, K.D.
Top. Curr. Chem.
46, 61 (1974)

(49) McCapra, F.
Prog. Org. Chem.
8, 231 (1973)

(50) Faulkner, L.R.
Int. Rev. Sci:
Phys. Chem. Ser. Two
9, 213 (1976)

(51) Marcus, R.A.
J. Chem. Phys.
43, 2654 (1965)

(52) Khan, A.U.
Kasha, M.
J. Chem. Phys.
39, 2105 (1963)

(53) Albrecht, H.O. — Z. Phys. Chem. 136, 321 (1928)

(54) Wilson, T. — Int. Rev. Sci: Phys. Chem. Ser. Two 9, 265 (1976)

(55) Ryan, M.A. Miller, R.J. Ingle Jr., J.D. — Anal. Chem. 50, 1772 (1978)

(56) Gundermann, K.D. Horstmann, W. Bergmann, G. — Liebigs Ann. Chem. 684, 127 (1965)

(57) Bergmann, G. — Erdöl-Kohle-Erdgas-Petrochem. 15, 612 (1962)

(58) Seitz, W.R. Neary, M.P. — Anal. Chem. 46, 188A (1974)

(59) Seitz, W.R. Hercules, D.M. — Int. J. Environ. Anal. Chem. 2, 273 (1973)

(60) Paul, D.B. — Talanta 25, 377 (1978)

(61) Isacsson, U. Wettermark, G. — Anal. Chim. Acta 68, 339 (1974)

(62) Hodgeson, J.A. McClenny, W.A. Hanst, P.L. — Science 182, 248 (1973)

(63) — KIM1 User Manual MOS Technology,Inc. Norristown 1976

(64) Strobel, H.A. — Chemical Instrumentation Addison-Wesley Publishing Co. Reading Mass. 1973

(65) Kaiser, H. Specker, H. — Z. Anal. Chem. 149, 46 (1956)

(66) Gleu, K.
Petsch, W.
Angew. Chem.
48, 57 (1935)

(67) Totter, J.R.
Photochem. Photobiol.
3, 231 (1964)

(68) Legg, K.D.
Hercules, D.M.
J. Am. Chem. Soc.
91, 1902 (1969)

(69) Maeda, K.
Hayashi, T.
Bull. Chem. Soc. Jpn.
40, 169 (1967)

(70) Dubovenko, C.I.
Beloshitskii, N.V.
J. Anal. Chem. USSR
29, 85 (1974)

(71) Totter, J.R.
Photochem. Photobiol.
22, 203 (1975)

(72) Janzen, E.G.
Pickett, J.B.
Happ, J.W.
De Angelis, W.
J. Org. Chem.
35, 88 (1970)

(73) Maeda, K.
Kashiwabara, T.
Tokuyama, M.
Bull. Chem. Soc. Jpn.
50, 473 (1977)

(74) Swinbourne, E.S.
Auswertung und Analyse
kinetischer Messungen
Verlag Chemie, Weinheim 1975

(75) Stevens, W.L.
Biometrics
7, 247 (1951)

(76) Weber, U.
Diplomarbeit, Bochum 1976

(77) Stern, O.
Volmer, M.
Physik. Z.
20, 183 (1919)

(78) Kreyszig, E.
Statistische Methoden und
ihre Anwendungen
Vandenhoeck + Ruprecht
Göttingen 1975

(79) Lippert, E.
Nägele, W.
Seybold-Blankenstein, W.
Staiger, U.
Voss, W.
Z. Anal. Chem.
170, 1 (1959)

(80) Montano, L.A.
Ingle Jr., J.D.
Anal. Chem.
51, 919 (1979)

(81) Haber, F.
Weiss, J.
Nature
20, 948 (1932)

(82) Baxendale, J.H.
Wells, C.F.
Trans. Faraday Soc.
53, 800 (1957)

(83) Burdo, T.G.
Seitz, W.R.
Anal. Chem.
47, 1639 (1975)

(84) Erdey, L.
Inczédy, I.
Acta chim. Acad. Sci. Hungar.
6, 93 (1955)

(85) Legg, K.D.
Hercules, D.M.
J. Phys. Chem.
74, 2114 (1970)

A Anhang

A 1 Verwendete Substanzen

Tabelle A1 gibt Herkunft und Reinheit der bei der Durchführung dieser Arbeit verwendeten Substanzen an.

Substanz	Lieferant	Reinheit
Anthracen	Aldrich	98,8%
Chininsulfat	Fluka	purum
Lucigenin	ICN Pharmaceutical,Inc.	99%
Kobaltsulfat	Merck	p.a.
Natronlauge	Merck	Titrisol
Wasserstoffperoxid	Merck	perhydrol
Schwefelsäure	Merck	Suprasol
i-Octan	Merck	Uvasol

Tabelle A1: Herkunft und Reinheit der verwendeten Substanzen

Als Lösungsmittel für H_2O_2, Verb. 1 und Lucigenin wurde bidestilliertes Wasser verwendet.

A 2 Faktoren zur Berechnung wahrer Fluoreszenzspektren

Tabelle A2 zeigt die wellenlängenabhängigen Korrekturfaktoren $F(\lambda)$. Sie ergeben sich nach Gleichung 6.12 als:

$$F(\lambda) = \frac{I_w}{I_b} \qquad (6.12)$$

Die Bestimmung der Faktoren wurde mit einer Lösung von Chininsulfat in Schwefelsäure vorgenommen. Die I_w konnten dabei der Literatur entnommen werden (79).

λ [nm]	$F(\lambda)$	λ [nm]	$F(\lambda)$
579	3,81	454	0,98
572	3,14	449	0,95
564	2,72	444	0,91
556	2,42	439	0,88
548	2,24	435	0,83
541	1,99	430	0,81
533	1,81	426	0,76
527	1,69	421	0,74
519	1,54	416	0,72
513	1,49	412	0,69
507	1,43	408	0,62
500	1,33	404	0,59
494	1,26	400	0,54
488	1,21	396	0,44
482	1,16	392	0,39
471	1,09	388	0,34
466	1,07	385	0,24

Tabelle A2: Wellenlängenabhängige Korrekturfaktoren für das Aminco-Bowman-Fluorimeter

A 3 Beschreibung der Rechenprogramme

A 3.1 KONZ

Das Fortran-Programm KONZ dient zur Durchführung einer Zweikomponentenanalyse nach Gleichung 6.7. Es basiert auf dem zur Rechnersoftware gehörigen Unterprogramm MINNB 2, welches das Minimum einer Zielfunktion nach einem Simplex-Verfahren sucht. Die Zielfunktion wird im Unterprogramm ZIEL gebildet. Dabei wird auch die Konzentrationsänderung während der Spektrenaufnahme berücksichtigt.
Im folgenden ist die Programmversion zur Auswertung der Anregungsspektren aufgelistet.

Eingabeparameter:

N	=	Anzahl der Punkte pro Spektrum
M	=	Anzahl der Spektren
V	=	Verstärkungsfaktor der Fluoreszenzmessung
ANFKON	=	Anfangskonzentration des Lucigenins
ENDKON	=	Endkonzentration des Methylacridons
EPS1F	=	Extinktionskoeffizient des Lucigenins bei der festen Emissionswellenlänge
EPS2F	=	Extinktionskoeffizient des Methylacridons bei der festen Emissionswellenlänge
WAS(I)	=	Intensitäten des Lösungsmittels
INT(I,J)	=	Intensitäten der während der Reaktion registrierten Spektren
KLUC(I)	=	Emissionskoeffizienten des Lucigenins
KACR(I)	=	Emissionskoeffizienten des Methylacridons
EPS1(I)	=	Extinktionskoeffizienten des Lucigenins
EPS2(I)	=	Extinktionskoeffizienten des Methylacridons

KONZ

```
      REAL INT(100,30),KLUC(100),KACR(100),WAS(100)
     1X(2),DX(2),DXS(2),XQ(2),XS(2),XSS(2),G(3),
     2Y(2,3),EPS1(100),EPS2(100),KONZ(2,30),ITER(30)
      INTEGER ITEST (30,2)
      COMMON INT,KLUC,KACR,EPS1,EPS2,EPS1F,EPS2F,N,
     1J,ENDKON
      EXTERNAL FUNCT
      READ (5,100) N,M,V,ANFKON,ENDKON,EPS1F,EPS2F
  100 FORMAT (7B)
      READ (5,200) (WAS(I),I=1,N)
      READ (5,200) ((INT(I,J),I=1,N),J=1,M)
  200 FORMAT (10B)
      DO 10 I=1,N
      DO 10 J=1,M
C     SUBTRAKTION DER UNTERGRUND-FLUORESZENZ
   10 INT(I,J) = INT(I,J)*V - WAS(I)*0,001
      READ (5,300) (KLUC(I),I=1,N)
      READ (5,300) (KACR(I),I=1,N)
  300 FORMAT (10B)
      DO 20 I=1,N
C     BERÜCKSICHTIGUNG DER FLUORESZENZLÖSCHUNG DURCH
C     0,033 M NATRONLAUGE
   20 KLUC(I) = KLUC(I)/8.936
      READ (5,400) (EPS1(I),I=1,N)
      READ (5,400) (EPS2(I),I=1,N)
  400 FORMAT (10B)
C     FESTLEGUNG DER ÜBERGABEPARAMETER AN MINNB 2
C     ABBRUCH DER ITERATION, WENN AENDERUNG DER
C     LUCIGENINKONZENTRATION KLEINER ALS
C     1 E-9 MOL/L WIRD
      X(1) = ANFKON
      X(2) = 1E-6
      NKOMP = 2
```

```
      NKOMP2 = 3
      ALPHA = 1.
      BETA = 0.5
      GAMMA = 2.
      EPS = 1E-9
      DO 60 J=1,M
      DX(1) = X(1)/10.
      DX(2) = X(2)/10.
      CALL MINNB2 (NKOMP,NKOMP2,X,FUNCT,DX,ALPHA,BETA,
     1GAMMA,EPS,DXS,XQ,XS,XSS,G,Y,F,IANZ,IKENN)
C     ABSPEICHERN DER KONZENTRATIONEN
      KONZ(1,J) = X(1)
      KONZ(2,J) = X(2)
C     ABSPEICHERN EINER KENNZAHL, DIE DEN GRUND DES
C     ITERATIONSABBRUCHS ANGIBT UND DER ANZAHL DER
C     ITERATIONSSCHRITTE
      ITEST(J,1) = KENN
      ITEST(J,2) = IANZ
C     ABSPEICHERN DER FEHLERQUADRATSUMME NACH BEENDETER
C     ANALYSE DES SPEKTRUMS
   60 ITER(J) = F
      DO 70 J=1,M
C     BERECHNUNG DER DEN KONZENTRATIONEN ZUGEHÖRIGEN
C     REAKTIONSZEIT (ABSTAND D. SPEKTREN 4 MINUTEN)
      IT = 4*(J-1)
      WRITE (6,500) IT
  500 FORMAT (1H0,8X,'ZEIT = ',I3,'MIN')
      WRITE (6,600) (KONZ(I,J),I=1,2)
  600 FORMAT (1H0,3X,'1. KONZENTRATION = ',E10.3,' MOL/L'
     1/,3X,'2. KONZENTRATION = ',E10.3,' MOL/L')
      WRITE (6,700) ITER(J)
  700 FORMAT (3X,'FEHLERQUADRATSUMME: ',F8.3)
      WRITE (6,800) ITEST(J,2),ITEST(J,1)
  800 FORMAT (3X,'ANZ. D. ITERATIONSSCHRITTE: ',I4,
     1/,3X,'ABBRUCHKRITERIUM: ',I4)
   70 CONTINUE
      STOP
      END
```

ZIEL

```
      SUBROUTINE FUNCT (NKOMP,X,F)
      REAL INT(100,30),KLUC(100),KACR(100),X(2),
     1EPS1(100),EPS2(100)
      COMMON INT,KLUC,KACR,EPS1,EPS2,EPS1F,EPS2F,
     1N,J,ENDKON
      F = 0.
      DO 10 I=1,N,2
C     BERECHNUNG DER ZUR ZEIT DER MEßPUNKTAUFNAHME
C     AKTUELLEN KONZENTRATIONEN
      A1 = X(1)*EXP(-9E-4*0.886*(I-1))
      A2 = X(2)+(ENDKON-X(2))*(1.-EXP(-9E-4*0.886*(I-1)))
C     BERECHNUNG DER ZIELFUNKTION NACH GLEICHUNG 6.7
   10 F = F+(INT(I,J)-(KLUC(I)*A1+KACR(I)*A2)
     1*EXP(-ALOG(10.)*(EPS1(I)*A1+EPS2(I)*A2)*0.2)
     2*EXP(-ALOG(10.)*(EPS1F*A1+EPS2F*A2)*0.2))**2
      RETURN
      END
```

A 3.2 INTBER

Das Fortran-Programm INTBER dient zur Berechnung von Emissionskoeffizienten und Fluoreszenzstrahlungsflüssen (s. Abschnitt 5.2). Sein Ablaufdiagramm ist in Abbildung A1 dargestellt. Es wird die Version der Berechnung von Anregungsspektren gezeigt, d.h. λ_a ist variabel, λ_f ist konstant.

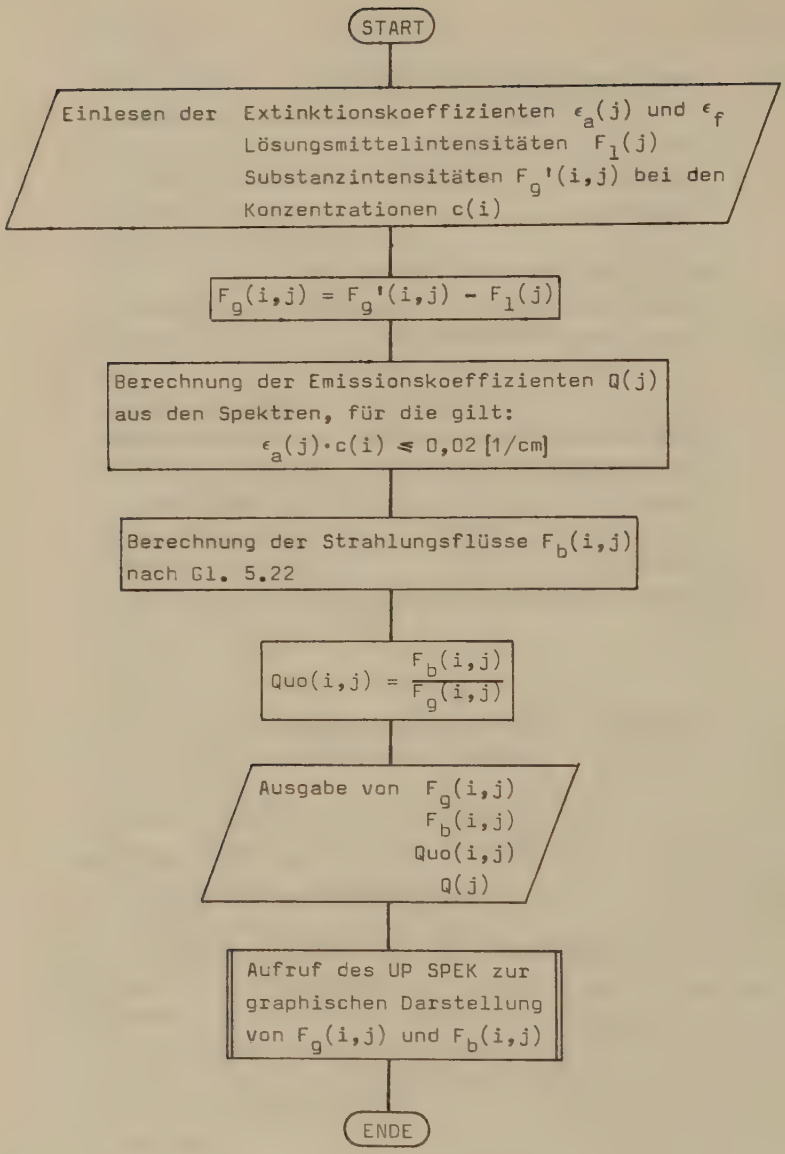


Abbildung A1: Ablaufdiagramm des Fortran-Programms INTBER

Lebenslauf

11.11.1951	geboren in Opladen als Sohn der Eheleute Helma und Siegfried Weber
1958 - 1962	Besuch der Volksschule in Opladen
1962 - 1970	Besuch der Landrat-Lucas-Schule I in Opladen
15.06.1970	Reifeprüfung auf dem mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig
WS 1970/71	Beginn des Chemiestudiums an der Ruhr-Universität Bochum
02.10.1972	Abschluß der Diplom-Vorprüfung
29.06.1976	Abschluß der Diplom-Hauptprüfung
September 1976 -	Beginn der Doktorarbeit am Lehrstuhl für Analytische Chemie der Ruhr-Universität
22.12.1978	Eheschließung mit Karin Ragutt aus Duisburg

SCHADEL GmbH BRD 8600 Bamberg Tel.: 0951/58461 u. 54414